

**Phagentyp-RNA-Polymerasen
in Tabak und *Arabidopsis*:
Neue Aspekte ihrer entwicklungsspezifischen Rolle
und zu potentiellen Interaktionspartnern**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Johanna Sobanski

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Stefan Hecht PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. Thomas Börner
2. Prof. Dr. Annegret Wilde
3. Prof. Dr. Sacha Baginsky

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2013

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	VII
Abstract	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Chloroplasten und Mitochondrien: Organellen der Pflanzenzelle	1
1.2 Transkription in Chloroplasten	2
1.2.1 Das Chloroplastengenom	2
1.2.2 Organelläre RNA-Polymerasen.....	3
1.2.2.1 Plastidenkodierte plastidäre RNA-Polymerase (PEP)	3
1.2.2.2 <i>RpoT</i> -Gene kodieren für mitochondriale und plastidäre RNA-Polymerasen	4
1.2.2.3 Kernkodierte plastidäre RNA-Polymerase (NEP)	6
1.2.3 Plastidäre Promotoren	7
1.2.3.1 PEP-Promotoren	7
1.2.3.2 NEP-Promotoren.....	9
1.2.3.3 Interne Promotoren von tRNAs	11
1.2.4 Transkriptionsfaktoren plastidärer RNA-Polymerasen.....	11
1.2.4.1 Spezifitätsfaktoren für PEP.....	11
1.2.4.2 Spezifitätsfaktoren der Phagentyp-RNA-Polymerasen.....	12
1.2.5 Regulation der plastidären Genexpression	14
1.2.5.1 Die Rolle der RpoTs und Arbeitsteilung zwischen NEP und PEP	15
1.3 Zielstellung der Arbeit.....	18
2 Material und Methoden	21
2.1 Material.....	21
2.1.1 Materialien und Anbieter	21
2.1.2 Pflanzenmaterial	21
2.1.3 Bakterienstämme	22
2.1.4 Plasmide	22
2.1.5 Synthetische Oligonukleotide (<i>primer</i>).....	25
2.1.6 Antikörper	25
2.1.7 Software	26
2.2 Methoden	26

2.2.1	Anzucht und Transformation von <i>E. coli</i>	26
2.2.2	Anzucht und Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	26
2.2.3	Pflanzenanzucht	27
2.2.4	Agrobakterien-vermittelte Transformation von <i>A. thaliana</i>	27
2.2.5	Plastidentransformation in <i>N. tabacum</i>	28
2.2.6	Chloroplastenisolation aus <i>N. tabacum</i>	28
2.2.7	Chloroplastenisolation aus <i>A. thaliana</i>	29
2.2.8	Mitochondrienisolation aus <i>A. thaliana</i>	29
2.2.9	Nukleinsäuren	29
2.2.9.1	Extraktion von Gesamt-DNA	29
2.2.9.2	Isolation von Chloroplasten-DNA	30
2.2.9.3	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	30
2.2.9.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	30
2.2.9.5	Klonierung	30
2.2.9.6	Reinigung von DNA-Fragmenten und Sequenzierung	31
2.2.9.7	Extraktion von RNA	31
2.2.9.8	Qualität und Quantifizierung von Nukleinsäuren	31
2.2.9.9	Agarosegelelektrophorese von DNA	31
2.2.9.10	Agarosegelelektrophorese von RNA	31
2.2.9.11	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von DNA	32
2.2.9.12	DNA-Transfer (<i>Southern Blot</i>)	32
2.2.9.13	RNA-Transfer (<i>Northern Blot</i>)	32
2.2.9.14	<i>Dot Blot</i> -Transfer präzipitierter RNA	33
2.2.9.15	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	33
2.2.9.16	Hybridisierung und Detektion von DNA-Sonden	34
2.2.9.17	<i>Primer extension</i> Analyse	34
2.2.9.18	Radioaktive Sequenzierung von DNA (<i>Fast Sequencing</i>)	35
2.2.9.19	Quantitative <i>real-time</i> PCR	35
2.2.9.20	5'-RACE Analyse	36
2.2.9.21	Detektion der Edierungsstelle von <i>rpoB</i> aus Tabak	37
2.2.9.22	Differentielle RNA-Sequenzierung (Illumina Sequenzierung)	37
2.2.10	Proteine	38
2.2.10.1	Isolation von Proteinen	38
2.2.10.2	Quantifizierung von Proteinlösungen	38
2.2.10.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
2.2.10.4	Protein-Transfer und Immunodetektion (<i>Western Blot</i>)	39
2.2.10.5	Immunopräzipitation (IP) für RIP-Chip und <i>Dot Blot</i>	40
2.2.10.6	IP zur Co-Präzipitation potentiell interagierender Proteine	40

2.2.10.7	Heterologe Expression von Epitop-markierten RpoTs aus <i>N. t.</i> und <i>A. t.</i> ...	41
2.2.10.7.1	Plasmide zur heterologen Expression Epitop-markierter RpoTs.....	41
2.2.10.7.2	Überexpression Epitop-markierter RpoTs	42
2.2.10.7.3	Reinigung Epitop-markierter RpoTs	42
2.2.10.8	<i>Pulldown assays</i> mit rekombinanten Epitop-markierten RpoTs.....	43
2.2.10.9	Massenspektrometrie: <i>peptide mass fingerprinting</i>	44
2.2.11	RIP-Chip.....	44
2.2.12	Unspezifische <i>in vitro</i> Transkription.....	45
2.2.13	Spezifische <i>in vitro</i> Transkription	45
3	Ergebnisse	47
3.1	Charakterisierung der entwicklungsspezifischen Rolle von NEP in Tabak	47
3.1.1	Austausch Polymerase-spezifischer Promotoren	47
3.1.2	Segregationsstatus der transplastomischen Pflanzen	50
3.1.3	Makroskopischer Phänotyp der transplastomischen Pflanzen	57
3.1.4	Die veränderte Promotornutzung kann auf RNA-Ebene gezeigt werden	60
3.1.5	Analyse des primären Transkriptoms der Tabakmutanten.....	66
3.1.5.1	Aktivierung zusätzlicher Promotoren in PEP/ <i>accD</i> und Δ NEP/ <i>accD</i>	66
3.1.5.2	Ein zusätzlicher Promotor stromaufwärts wird in PEP/ <i>rpoB</i> aktiviert	70
3.1.5.3	Keine signifikanten Effekte in Δ NEP/ <i>rrn16</i>	70
3.1.6	Einfluss der veränderten Promotoren auf Transkriptmengen.....	72
3.1.6.1	<i>rrn16</i> Transkriptmengen sind unverändert in Δ NEP/ <i>rrn16</i>	72
3.1.6.2	Die Transkription von <i>accD</i> durch PEP führt zur leichten Überexpression	73
3.1.6.3	Die RNA-Mengen in PEP/ <i>rpoB</i> sind verringert	76
3.1.7	Die Edierung der <i>rpoB</i> -Transkripte wird nicht beeinflusst in PEP/ <i>rpoB</i>	78
3.1.8	Auswirkungen der Promotorveränderungen auf Protein-Ebene	79
3.1.9	Auswirkungen der Promotoraustausche für <i>accD</i> , <i>rpoB</i> und <i>rrn16</i>	81
3.2	Suche nach potentiellen Transkriptionsfaktoren von RpoTs.....	82
3.2.1	<i>In vivo</i> Expression und IP Epitop-markierter RpoTp in Tabak.....	82
3.2.2	<i>Pulldown assays</i> mit <i>N. tabacum</i> und <i>A. thaliana</i>	86
3.2.2.1	Heterologe Expression und Reinigung von 6xHis-At/Nt-RpoTp und 6xHis-At/Nt-RpoTmp	86
3.2.2.2	<i>Pulldown assays</i> mit 6xHis-At/Nt-RpoTp und 6xHis-At/Nt-RpoTmp	88
3.2.2.3	Heterologe Expression und Reinigung von GST-At/Nt-RpoTp	90
3.2.2.4	<i>Pulldown assays</i> mit GST-At/Nt-RpoTp	91
3.2.3	<i>In vivo</i> Expression Epitop-markierter RpoTs in <i>A. thaliana</i>	91
3.2.3.1	Identifizierung transgener Linien durch PCR	92

3.2.3.2	Proteinexpression in den transgenen Linien	93
3.2.3.3	Funktionalität der Epitop-markierten, <i>in vivo</i> exprimierten AtRpoTs	95
3.2.3.4	Die RpoT-Überexpression wirkt sich auf RNA-Ebene, nicht jedoch auf Proteinebene aus	97
3.2.3.5	Phänotyp der transgenen Pflanzen unter Standardbedingungen	99
3.2.3.6	3xFLAG-Tp ist kältesensitiv	100
3.2.3.7	Organelläre und subplastidäre Lokalisation von RpoTp und RpoTmp ...	102
3.2.3.8	Der Anteil membranassoziierter NEP nimmt im Lauf der Entwicklung zu	104
3.2.3.9	Immunopräzipitation von 3xFLAG-RpoTp und 3xFLAG-RpoTmp	106
3.2.4	Untersuchung der Kandidaten für eine Interaktion: Ycf1 und Ycf2	110
3.2.5	Co-Präzipitation von NEP-Transkripten mit 3xFLAG-AtRpoTp	111
4	Diskussion	115
4.1	Charakterisierung der entwicklungsspezifischen Rolle von NEP in Tabak durch Promotoraustausche in transplastomischem Tabak	115
4.1.1	Erzeugung der transplastomischen Pflanzen	115
4.1.2	Das Ausschalten des <i>rrn16</i> -NEP-Promotors hat kaum Effekte auf die Transkription des <i>rrn</i> -Operons	120
4.1.3	Ist die Transkription des <i>rrn</i> -Operons teilweise lichtreguliert?	123
4.1.4	Die Veränderung von <i>PaccD</i> -129 führt zur Aktivierung alternativer Promotoren	125
4.1.5	NEP kann die Transkription von <i>rpoB</i> durch NEP nicht vollständig ersetzen .	130
4.1.6	Der Polymerasetyp hat keinen wesentlichen Einfluss auf die 5'-Prozessierung	133
4.2	Suche nach potentiellen Transkriptionsfaktoren der RpoTs	135
4.2.1	IP <i>in vivo</i> exprimierter, Epitop-markierter RpoTp in Tabak	136
4.2.2	Heterologe Expression der RpoTs aus Tabak und <i>Arabidopsis</i>	137
4.2.3	<i>In vivo</i> Expression Epitop-markierter RpoTs in <i>Arabidopsis</i> und Charakterisierung der transgenen Pflanzen	139
4.2.3.1	3xFLAG-RpoTp ist kältesensitiv	141
4.2.3.2	RpoTmp aus <i>Arabidopsis</i> ist in den Chloroplasten und Mitochondrien lokalisiert sowie in den Plastiden wie auch RpoTp teilweise membrangebunden	143
4.2.3.3	Immunopräzipitation von 3xFLAG-RpoTp und 3xFLAG-RpoTmp	145
4.2.4	Ycf1 und Ycf2 als Kandidaten für eine Interaktion mit NEP	146
4.2.5	Co-Präzipitation von RNAs	148
5	Literatur	153

Anhang	XIII
Danksagung	XVII
Lebenslauf	XVIII
Selbständigkeitserklärung	XXI

Zusammenfassung

An der Transkription in den Plastiden höherer Pflanzen sind neben der plastidärkodierten, eubakterienähnlichen RNA-Polymerase PEP auch die kernkodierte RNA-Polymerase vom T3/T7-Phagentyp RpoTp und RpoTmp, die gemeinsam die sogenannte NEP-Aktivität repräsentieren, beteiligt.

Da für NEP bislang keine Transkriptionsfaktoren identifiziert wurden, wurden in dieser Arbeit die entsprechenden Enzyme aus *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum* mit verschiedenen, N-terminalen Epitopen (6xHis bzw. GST) heterolog in *E. coli* exprimiert, affinitätsgereinigt und für *pull-down assays* zur Identifikation interagierender Proteine eingesetzt. Des Weiteren wurden Epitop-markierte RpoTp aus Tabak und *Arabidopsis*-RpoTp und -Tmp *in vivo* überexprimiert und zur Co-Immunopräzipitation mit Epitop-spezifischen Antikörpern verwendet. In diesen Studien wurden als potentielle Interaktionspartner von RpoTp Ycf1 und Ycf2 gefunden. Deren mögliche Rolle im Zusammenhang mit RpoTp wird diskutiert.

Des Weiteren konnte mit den 3xFLAG-RpoTp- bzw. RpoTmp-exprimierenden *Arabidopsis*-Mutanten gezeigt werden, dass beide Phagentyp-RNA-Polymerasen teilweise membranassoziiert sind und diese Assoziation mit den Thylakoiden im Zuge der Entwicklung zunimmt. Außerdem wurde mit einem FLAG-spezifischen Antikörper die duale Lokalisation der *Arabidopsis* RpoTmp in den Chloroplasten und Mitochondrien nachgewiesen.

Darüber hinaus wurden Effekte der Überexpression der *Arabidopsis*-Enzyme auf den Phänotyp, RNA- und Protein-Level untersucht. Mittels RIP-Chip wurden mit RpoTp assoziierte RNAs analysiert und mögliche, bisher unbekannte NEP-Transkripte gefunden. Zudem wird die Sensitivität von 3xFLAG-RpoTp-exprimierenden Pflanzen gegenüber Kältestress diskutiert.

Die meisten plastidären Haushaltsgene besitzen sowohl PEP- als auch NEP-Promotoren. Das Modell einer rein sequentiellen Arbeitsteilung der beiden Polymerase-Aktivitäten musste bereits in der Vergangenheit erweitert werden, da NEP und PEP während der gesamten Blattentwicklung aktiv sind. Anhand transplastomischer Tabakpflanzen, in denen die NEP-Promotoren von *accD* und *rpoB* gegen einen PEP-Promotor ausgetauscht bzw. die NEP-Promotoren von *accD* und *rrn16* durch Mutagenese ausgeschaltet wurden, sollte die Arbeitsteilung von NEP und PEP in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium beleuchtet werden. Dabei wurde gezeigt, dass die Transkription von *accD* durch PEP zu einer leichten Überexpression und auch zur Aktivierung einer alternativen TSS *TaccD-557* führte. Für *rpoB* dagegen resultierte die Transkription durch PEP statt NEP in einer verzögerten Entwicklung und verringerten Transkriptmengen, sowie der Aktivierung eines potentiellen neuen Promotors *TrpoB-608*. Das Ausschalten des *accD*-Promotors resultierte in Pflanzen mit einer leicht verzögerten Entwicklung sowie wildtypischen Transkript- und Proteinmengen. Die Herkunft dieser Transkripte wird einerseits durch die Aktivierung zweier bisher unbekannter TSSs erklärt, und andererseits durch die Identifikation eines alternativen Promotors *PaccD-158*, welcher auch im Wildtyp genutzt wird. Der Verlust des NEP-Promotors für *rrn16* zeigte kaum Effekte. Es wird diskutiert, inwiefern die Rolle und Arbeitsteilung von NEP und PEP individuell für einzelne Gene in Abhängigkeit von ihrer jeweiligen Funktion betrachtet werden muss. Zudem deuten die gezeigten Daten darauf hin, dass der transkribierende Polymerasetyp keinen Einfluss auf die Prozessierung des 5'-Endes der primären Transkripte hat, sondern vermutlich eher unterschiedliche Transkriptstabilitäten die Effekte auf RNA- und Proteinebene erklären.

Schlagworte: Chloroplast, Transkription, Promotor, Phagentyp-RNA-Polymerase, NEP

Abstract

The transcription in plastids of higher plants is accomplished by the plastid encoded, eubacterial-type RNA polymerase PEP and also by the nuclear encoded, T3/T7-phagetype RNA polymerases RpoTp and RpoTmp, which together represent the so-called NEP activity. As the identification of transcription factors for NEP failed so far, in this work the corresponding enzymes from *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum* containing different, N-terminally fused epitope tags (6xHis and GST) were heterologously expressed in *E. coli*, affinity-purified and used for pulldown assays to identify interacting proteins. Furthermore epitope-tagged RpoTp from tobacco and RpoTp and -Tmp from *Arabidopsis* were overexpressed *in vivo* and applied for co-immunoprecipitation with epitope-specific antibodies. In these studies Ycf1 and Ycf2 were found as potential interaction partners of RpoTp. Their possible role in connection with RpoTp is discussed. In addition, the 3xFLAG-RpoTp- and -RpoTmp-expressing *Arabidopsis* mutants were used to show, that both phagetype RNA polymerases are partly associated with the thylakoid membrane and that this binding increases during development. Further, immunoblot assays with a FLAG-specific antibody confirmed the dual localization of the *Arabidopsis* RpoTmp in chloroplasts as well as in mitochondria. Moreover, the effects of overexpression of the *Arabidopsis* enzymes on the phenotype, RNA and protein levels were investigated. Via RIP-Chip analyses RNAs associated with RpoTp were analysed and potential new NEP transcripts were found. Besides, the sensibility of 3xFLAG-RpoTp-expressing plants towards cold stress is discussed. Most plastidial housekeeping genes possess PEP as well as NEP promoters. The model of a sequential division of labor between both polymerase activities had to be extended in the past, since NEP and PEP are active during the whole leaf development. The division of labor between NEP and PEP according to the developmental stage was studied on the basis of transplastomic tobacco plants, in which the NEP promoters of *accD* and *rpoB* have been exchanged with a PEP promoter or the NEP promoters of *accD* and *rrn16* have been knocked out by mutagenesis. It was shown, that transcription of *accD* by PEP lead to a slight overexpression and also to activation of an alternative TSS TaccD-557. However, transcription of *rpoB* by PEP instead of NEP resulted in delayed development and decreased transcript levels, as well as in activation of a potential new promoter, TrpoB-608. Knock out of the *accD* promoter resulted in plants with a slightly delayed development as well as transcript and protein levels resembling those of the wildtype. The origin of these transcripts is on the one hand explained by activation of two new TSSs, and on the other hand by identification of an alternative promoter PaccD-158, that is also used in the wildtype. Loss of the *rrn16* NEP promoter did not exhibit strong effects. It is discussed, how the roles and the division of labor of NEP and PEP should be considered individually for each gene according to its function. Furthermore the shown data suggests, that the transcribing polymerase type has no influence on processing of the 5' end of transcripts, but maybe different transcript stabilities can explain the effects on RNA and protein level.

keywords: chloroplast, transcription, promoter, phagetype RNA polymerases, NEP

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
<i>A. bidest</i>	bidestilliertes Wasser
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
At, <i>A. t.</i> bzw. <i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
(d)ATP	(Desoxy) Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
BLAST	<i>Basic alignment search tool</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Carb	Carbenicillin
(μ)Ci	(Mikro) Curie
Cm	Chloramphenicol
col	Ökotyp Columbia
cpDNA	plastidäres Genom
cpm	<i>counts per minute</i> (Zerfälle pro Minute)
CTAB	Cethyltrimethylammoniumbromid
(d)CTP	(Desoxy) Cytosintriphosphat
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DMF	N,N-Dimethylformamid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
(d)GTP	(Desoxy) Guanosintriphosphat
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HCl	Salzssäure
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl] Piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]
HFS-RpoTp	RpoTp mit den N-terminalen Epitopen HA-FLAG-StrepII
His	Histidin
h-mtRPOL	humane mitochondriale RNA-Polymerase
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)

<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galaktosid
IR	invertierte Sequenzwiederholung des Plastoms (<i>inverted repeats</i>)
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
Kan	Kanamycin
kPa	Kilopascal
l	Liter
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LSC	roße Einzelkopie-Region des Plastoms (<i>large single copy region</i>)
mA	Milliampere
MEN	MOPS-EDTA-NaAc-Puffer
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
μ l	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MnCl ₂	Manganchlorid
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
MS-Medium	Murashige und Skoog Medium
mtDNA	mitochondriales Genom
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NEP	nukleärkodierte (plastidäre) RNA-Polymerase
Ns, <i>N. s.</i> bzw. <i>N. silvestris</i>	<i>Nicotiana silvestris</i>
nt	Nukleotid(e)
Nt, <i>N. t.</i> bzw. <i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
(d)NTP	(Desoxy) Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
PEP	plastidär kodierte (plastidäre) RNA-Polymerase
PEP/ <i>accD</i>	<i>PatpB-255::accD</i>
PEP/ <i>rpoB</i>	<i>PatpB-255::rpoB</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Photosystem
RACE	<i>Rapid amplification of cDNA ends</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)

RpoT	RNA-Polymerase vom T7/T3-Typ
RT	Reverse Transkriptase, Raumtemperatur
RuBisCO	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase
s	Sekunde
s.	siehe
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sog.	Sogenannt
Spec	Spectinomycin
SSC	kleine Einzelkopie-Region des Plastoms (<i>small single copy region</i>)
Strep	Streptomycin
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAP	<i>tobacco acid pyrophosphatase</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	NNN'N' Tetramethyl-ethylendiamin
TL	Transgene Linie
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer RNA
TSS	Transkriptionsstartstelle
(d)TTP	(Desoxy) Thymidintriphosphat
U	Uracil, Unit
UE	Untereinheit(en)
üN	über Nacht
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultra violett
V	Volt
VMF-RpoTp	RpoTp mit den N-terminalen Epitopen VSV-cMyc-FLAG
Vol.	Volumen
Vol.-%	Volumenprozent
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-Galaktosid
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
z. B.	zum Beispiel
Δ NEP/ <i>accD</i>	Δ PaccD-129:: <i>accD</i>
Δ NEP/ <i>rrn16</i>	Δ Prn16-64:: <i>rrn16</i>

Genbezeichnungen

<i>accD</i>	Gen für die α -Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase
<i>atp8</i>	Gen für die Untereinheit VIII der mitochondrialen ATPase
<i>atpB</i>	Gen für die CF1 ATPase-Komplex β -Untereinheit
<i>clpP</i>	Gen für die proteolytische Untereinheit der ATP-abhängigen Clp-Protease
<i>cox2</i>	Gen für die Untereinheit II der mitochondrialen Cytochrom c Oxidase
<i>ndhC</i>	Gen für die Untereinheit III des NADH-Dehydrogenase
<i>psbA</i>	Gen für das D1-Protein des PS II

<i>psbD</i>	Gen für das D2-Protein des PS II
<i>psbE</i>	Gen für das Protein V des PS II
<i>rbcL</i>	Gen für die große Untereinheit der RuBisCO
<i>rpoA</i>	Gen für die α -Untereinheit der RNA-Polymerase
<i>rpoB</i>	Gen für die β -Untereinheit der RNA-Polymerase
<i>rpoC1</i>	Gen für die β' -Untereinheit der RNA-Polymerase
<i>rpoC2</i>	Gen für die β'' -Untereinheit der RNA-Polymerase
<i>RpoTm</i> bzw.	
<i>RpoT;1</i>	Gen für die mitochondriale Phagentyp-RNA-Polymerase RpoTm
<i>RpoTmp</i> bzw.	
<i>RpoT;2</i>	Gen für die mitochondriale und plastidäre RpoT RpoTmp
<i>RpoTp</i> bzw.	
<i>RpoT;3</i>	Gen für die plastidäre Phagentyp-RNA-Polymerase RpoTp
<i>RPO41</i>	Gen für die mitochondriale RNA-Polymerase in <i>S. cerevisiae</i>
<i>rrn16</i>	Gen für die ribosomale RNA 16S
<i>rrn18</i>	Gen für die ribosomale RNA 18S
<i>trnC</i>	Gen für die tRNA ^{Cys}
<i>trnE</i>	Gen für die tRNA ^{Glu}
<i>trnG</i>	Gen für die tRNA ^{Gly}
<i>trnH</i>	Gen für die tRNA ^{His}
<i>trnR</i>	Gen für die tRNA ^{Arg}
<i>trnS</i>	Gen für die tRNA ^{Ser}
<i>trnT</i>	Gen für die tRNA ^{Thr}
<i>trnV</i>	Gen für die tRNA ^{Val}
<i>UBQ</i>	Gen für das Protein Ubiquitin
<i>ycf</i>	<i>hypothetical chloroplast open reading frame</i>

1 Einleitung

1.1 Chloroplasten und Mitochondrien: Organellen der Pflanzenzelle

Chloroplasten und Mitochondrien sind Organellen der Zellen höherer Pflanzen und erfüllen im Metabolismus der Pflanzenzelle spezielle Funktionen. Mitochondrien sind die Orte der zellulären Atmung, in deren Zuge durch die Kopplung enzymatischer Reaktionen mit Elektronentransport und oxidativer Phosphorylierung ATP erzeugt wird (Saraste, 1999). In den Chloroplasten findet neben Reaktionen des Aminosäure- und Lipidstoffwechsels, der Assimilation von Nitrat und Sulfat, und der Biosynthese einer Vielzahl von Substanzen wie Vitaminen, Pflanzenhormonen und Tetrapyrrolen als wesentlicher Prozess die Photosynthese statt (Lopez-Juez und Pyke, 2005). Dabei werden unter Nutzung von Sonnenenergie und Kohlendioxid organische Kohlenwasserstoffe produziert und Sauerstoff freigesetzt.

Beide Organellen stammen ursprünglich von frei lebenden Bakterien ab. Die Vorläufer der Mitochondrien waren Purpurbakterien (α -Proteobakterien; Yang *et al.*, 1985; Gray *et al.*, 1999), die der Plastiden Cyanobakterien (Delwiche *et al.*, 1995). Diese Cyanobakterien wurden durch Endosymbiose in eine frühe, eukaryotische Wirtszelle aufgenommen, die bereits einen mitochondrialen Vorläufer enthielt (Gray, 1992; McFadden, 2001; Dyall *et al.*, 2004). Im Zuge der Evolution wurde ein Großteil der zu den Genomen der Endosymbionten gehörenden Gene in den Zellkern des Wirts transferiert. Andere Gene wurden substituiert oder vollständig verloren, sodass das Plastidengenom (Plastom) und das Mitochondriengenom (Chondrom) drastisch reduziert wurden und auf genetischer Ebene eine Abhängigkeit der Organellen vom Zellkern resultierte (Martin und Herrmann, 1998; Gray *et al.*, 1999; Gray, 1999; Timmis *et al.*, 2004). Dieser Transfer organellärer Gene in den Nukleus ist in Pflanzen ein fortschreitender Prozess (Timmis *et al.*, 2004; Leister, 2005). Das Plastom kodiert nur noch 10-20 % der plastidären Proteine, welche hauptsächlich in der Photosynthese und Genexpression fungieren (Martin, 2003). Demgegenüber befinden sich in den Plastiden höherer Pflanzen 1000-5000 Genprodukte, die im Kern kodiert und transkribiert, im Cytoplasma synthetisiert und mittels N-terminaler Transitsequenzen in die Chloroplasten transportiert werden (Martin und Herrmann, 1998; Abdallah *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2002; Herrmann, 2003; Richly und Leister, 2004). Viele plastidäre Protein-Komplexe setzen sich sogar aus chloroplastenkodierten und kernkodierten Komponenten zusammen, wie beispielsweise RubisCO oder Acetyl-CoA-Carboxylase.

1.2 Transkription in Chloroplasten

1.2.1 Das Chloroplastengenom

Plastidäre Genome in Landpflanzen sind hochkonserviert. Dies betrifft sowohl die Sequenzen als auch die Struktur (Wakasugi *et al.*, 2001). Für einige Pflanzen sind bereits vollständige Plastomsequenzen veröffentlicht (Übersicht in Jansen *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2006: <http://chloroplast.cbio.psu.edu>), darunter auch für die in dieser Arbeit verwendeten Modellpflanzen *Arabidopsis thaliana* (Sato *et al.*, 1999) und *Nicotiana tabacum* (Shinozaki *et al.*, 1986). Die zumeist ringförmigen, plastidären Chromosomen haben typischerweise eine Größe von 120-160 Kilobasen (kb) und enthalten ca. 60-200 Gene, die im Wesentlichen für Komponenten der Photosynthese (z.B. für PS I und II, ATP-Synthase) und der Genexpression (z.B. für tRNAs, rRNAs, PEP-Untereinheiten) kodieren (Maier und Schmitz-Linneweber, 2004). Zudem wurden kürzlich Gene für weitere nichtkodierende RNAs mit bisher unbekannter Funktion gefunden (Zhelyazkova *et al.*, 2012b). Die Plastome der meisten bisher untersuchten Pflanzen liegen je nach Plastidentyp mit 5-10000 Kopien pro Zelle vor (Palmer, 1991; Sugiura, 1995). Neben der doppelsträngigen, zirkulären Variante sind mittlerweile auch komplex-verzweigte sowie multimere, lineare Plastomstrukturen bekannt (Bendich, 2004; Oldenburg und Bendich, 2004). Des Weiteren ist die cpDNA in Protein-DNA-Komplexen (Nukleoiden; Übersicht in Sato *et al.*, 2003) organisiert. Den Plastomen der meisten photosynthetischen Eukaryoten sind zwei invertierte Sequenzwiederholungsbereiche (*inverted repeats*, IRs) gemein, die einen kleinen Einzelkopiebereich (*small single copy region*, SSC) von einem großen Einzelkopiebereich (*large single copy region*, LSC) trennen und Gene für ribosomale RNAs sowie meist für weitere plastidäre RNAs und Proteine tragen. Plastidäre Gene sind oft als polycistronische Einheiten mit unterschiedlicher Orientierung organisiert (Übersicht in Sugita und Sugiura, 1996). Die durch Transkription resultierende Vorläufer-RNA wird posttranskriptionell prozessiert in mono- und oligocistronische RNAs (Barkan, 2004; Sugita und Sugiura, 1996). Auch nicht-kodierende Intron-Bereiche, die durch Spleißen aus der plastidären RNA entfernt werden, sind bekannt (Schmitz-Linneweber und Barkan, 2007). Neben den bereits identifizierten Genen existieren zudem sog. offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF, bzw. moderner auch *hypothetical chloroplast reading frame*, *ycf*), deren Genprodukten bisher noch keine eindeutige Funktion zugeordnet werden konnte (Sugiura, 1992).

1.2.2 Organelläre RNA-Polymerasen

Da Chloroplasten von Prokaryoten abstammen, ist auch ihre Transkriptionsmaschinerie der von Eubakterien ähnlich. Neben einer plastidär kodierten RNA-Polymerase (RNAP) vom Eubakterientyp (*plastid encoded plastid RNA-polymerase*, PEP) besitzen Plastiden jedoch noch zwei weitere RNAPs vom T3/T7-Phagentyp, welche im Nukleus kodiert werden (*nuclear encoded plastid RNA-polymerase*, NEP; Übersichten in Liere und Maliga, 2001; Liere und Börner, 2007; Liere *et al.*, 2011). In den Mitochondrien wird die Transkription ebenfalls von mindestens einer kernkodierten Phagentyp-Polymerase bewerkstelligt, welche die ursprüngliche, prokaryotische RNAP des Endosymbionten ersetzt hat (Tracy und Stern, 1995; Hess und Börner, 1999). Eine Besonderheit der RNAPs der T3-, T7- und SP6-Bakteriophagen besteht darin, dass sie aus einem einzelnen Polypeptid bestehen (s. Abb. 2). Außerdem ist die gut charakterisierte Polymerase des T7-Phagen ohne assoziierte Hilfsfaktoren in der Lage, Promotoren spezifisch zu erkennen sowie die Elongation und Termination der Transkripte zu katalysieren (Cheetham und Steitz, 2000).

1.2.2.1 Plastidenkodierte plastidäre RNA-Polymerase (PEP)

Die intensiv untersuchte RNA-Polymerase in *Escherichia coli* (*E. coli*) besteht aus einem *core*-Enzym mit den Untereinheiten $2\alpha\beta\beta'$, welches die katalytische Aktivität besitzt und zur spezifischen Promotorerkennung und Transkriptionsinitiation unterschiedliche σ -Faktoren benötigt (Ishihama, 2000). In allen bisher untersuchten nicht-parasitären Pflanzen und Algen kodieren die plastidären Gene *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* und *rpoC2* die RNA-Polymerase-Untereinheiten α , β , β' , und β'' , welche homologe Proteine der Untereinheiten (UE) der eubakteriellen RNAP darstellen (Liere und Börner, 2007). Die Gene *rpoB*, *rpoC1* und *rpoC2* bilden wie in Cyanobakterien ein Operon (Shinozaki *et al.*, 1986; Hudson *et al.*, 1988; Little und Hallick, 1988; Hu *et al.*, 1991; Kaneko *et al.*, 1996), während *rpoA* gemeinsam mit Genen für ribosomale Proteine transkribiert wird (Purton und Gray, 1989). Das katalytisch aktive Enzym setzt sich aus zwei α -Untereinheiten sowie den UEs β , β' , und β'' zusammen (s. Abb. 2) und wird ähnlich der eubakteriellen RNAP durch kernkodierte σ -Faktoren ergänzt (s. Kap. 1.2.4.1). PEP kann sowohl als lösliche Fraktion aus Chloroplastenlysaten isoliert werden (Hu und Bogorad, 1990; Hu *et al.*, 1991), als auch in unlöslicher, DNA-assoziiierter Form zusammen mit weiteren Proteinen als sogenanntes transkriptionsaktives Chromosom (*transcriptionally active chromosome*, TAC; Briat *et al.*, 1979; Little und Hallick, 1988; Suck *et al.*, 1996; Pfalz *et al.*, 2006). Lösliche PEP aus Etioplasten enthält vor allem die Kernuntereinheiten, während in PEP-Präparationen aus reifen Chloroplasten zusätzliche Proteine assoziiert sind, die eine Rolle bei der Transkription und Transkriptionsregulation

insbesondere durch verschiedene Lichtbedingungen und photosynthetische Aktivität spielen (Pfannschmidt und Link, 1994 und 1997; Baginsky *et al.*, 1999; Pfannschmidt *et al.*, 2000; Steiner *et al.*, 2011). Der hohe Grad der Konservierung zwischen eubakterieller RNAP und PEP wird deutlich durch die Sensitivität von PEP gegenüber bekannten, bakteriellen Transkriptionseinhibitoren wie beispielsweise Tagetitoxin (Mathews und Durbin, 1990; Sakai *et al.*, 1998).

1.2.2.2 ***RpoT*-Gene kodieren für mitochondriale und plastidäre RNA-Polymerasen**

Die Transkription in Mitochondrien erfolgt durch kernkodierte Phagentyp-RNA-Polymerasen (Tracy und Stern, 1995; Hess und Börner, 1999; Liere und Börner, 2007). Der Vorläufer dieser und der phagenkodierte Polymerasen war vermutlich eine DNA-Polymerase oder eine Reverse Transkriptase (McAllister und Raskin, 1993; Cermakian *et al.*, 1997). Die meisten Eukaryoten besitzen für eine solche phagentypische Polymerase nur ein entsprechendes Gen im Kerngenom. In *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) wird die verantwortliche RNAP durch *RPO41* kodiert (Greenleaf *et al.*, 1986; Masters *et al.*, 1987), menschliche Mitochondrien besitzen die Phagentyp-RNAP h-mtRPOL als Teil der Transkriptionsmaschinerie (Tiranti *et al.*, 1997; Falkenberg *et al.*, 2002). In *Physcomitrella patens* und Angiospermen hingegen werden die Phagentyp-Polymerasen durch eine kleine Familie von *RpoT*-Genen (*RNA polymerase of the phage T3/T7 type*) kodiert. Im Zuge der Evolution der Pflanzen kam es zu mehreren, unabhängigen Dublikationen des für die mitochondriale RNAP (RpoTm) kodierenden Gens, wodurch Gene für eine zweite mitochondriale RNAP in *Nuphar advena* (Yin *et al.*, 2010) oder auch für die plastidäre RNAP (RpoTp) in vermutlich allen Angiospermen, sowie die dual-lokalisierten RNAPs (RpoTmp) in *Physcomitrella* und Eudikotyledonen entstanden (Hedtke *et al.*, 1997 und 2000; Übersichten in Hess und Börner, 1999; Weihe, 2004; Shiina *et al.*, 2005; Liere und Börner, 2007). Die Lokalisation der jeweils kodierten RNAP wird durch N-terminale Transitsequenzen bestimmt. GFP-Fusionsstudien mit diesen Sequenzen der Enzyme aus den Dikotylen *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*; *A. t.*) und *Nicotiana glauca* (*N. glauca*; *N. g.*), die jeweils drei *RpoT*-Gene besitzen, deuteten auf die Lokalisation der Polymerasen in Mitochondrien (RpoT;1 bzw. RpoTm), Plastiden (RpoT;3 bzw. RpoTp) bzw. beiden Organellen hin (RpoT;2 bzw. RpoTmp; Hedtke *et al.*, 1997, 1999, 2000 und 2002; Kobayashi *et al.*, 2001 und 2002). In der allotetraploiden Pflanze *Nicotiana glauca* (*N. glauca*; *N. g.*), einer Kreuzung aus den diploiden Spezies *N. glauca* und *N. glauca*, wurden sogar sechs *RpoT*-Gene gefunden (Hedtke *et al.*, 2002). Bei diesen Genen handelt es sich um zwei orthologe Sets aus

je drei Genen (*RpoTp*, *RpoTm* und *RpoTmp*) von jedem Elter. Monokotyledonen besitzen nur zwei *RpoT*-Gene für eine mitochondriale und eine plastidäre Polymerase (Chang *et al.*, 1999; Ikeda und Gray; 1999; Emanuel *et al.*, 2004; Kusumi *et al.*, 2004). *Physcomitrella* kodiert drei RNAPs, von denen zwei entsprechend den GFP-Lokalisationsstudien als *RpoTmp1* und *RpoTmp2* bezeichnet wurden (Kabeya *et al.*, 2002; Richter *et al.*, 2002). Die Regulation der dualen Lokalisation findet höchstwahrscheinlich auf Ebene der Translation statt, da die mRNAs von *Physcomitrella* wie auch von Dikotyledonen zwei potentielle Startkodons enthalten. Die Nutzung des ersten Startkodons ermöglichte den Transport von GFP in beide Organellen, während die Translation vom zweiten AUG zum Import ausschließlich in die Mitochondrien führte (Hedtke *et al.*, 2000 und 2002; Kobayashi *et al.*, 2001; Richter *et al.*, 2002). Die zusätzliche Fusion der 5'-UTR verhinderte jedoch die Nutzung des ersten AUG, sodass gefolgert wurde, dass die duale Lokalisation ein Artefakt darstellte und die entsprechenden Gene mitochondriale Polymerasen kodieren (Kabeya und Sato, 2005).

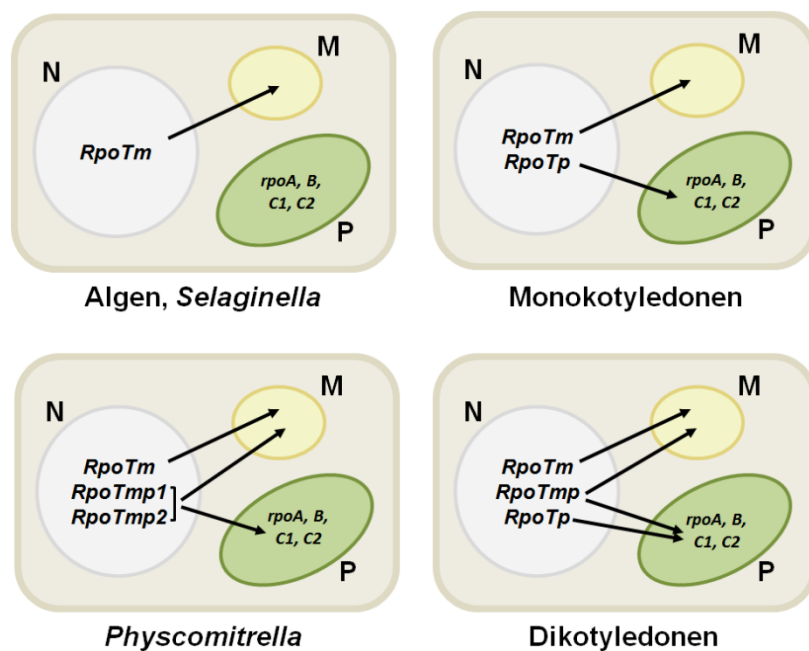


Abb. 1: Verbreitung organellärer Phagentyp-RNA-Polymerasen in verschiedenen Spezies. Das Kerngenom von Eukaryoten kodiert die Polymerasen vom T3/T7-Phagentyp, welche nach ihrer Expression im Nukleus (N) in die Mitochondrien (M) oder Plastiden (P) transportiert werden. Grünalgen wie *Chlamydomonas* und die Lycophyte *Selaginella* besitzen ein *RpoT*-Gen, welches für die mitochondriale Polymerase kodiert. Monokotyledonen haben eine mitochondriale (*RpoTm*) und eine chloroplastidär lokalisierte Phagentyp-Polymerase. *Physcomitrella* kodiert im Kern eine mitochondriale Polymerase und zwei RNAPs mit dualer Lokalisation in Plastiden und Mitochondrien. Dikotyle Pflanzen haben im Kerngenom drei *RpoT*-Gene, deren Produkte in die Mitochondrien bzw. die Chloroplasten oder in beide Organellen importiert werden. Nach Liere *et al.*, 2011.

Jedoch wurden RpoTp und auch RpoTmp mit spezifischen Antikörpern in Chloroplasten detektiert (Mais: Chang *et al.*, 1999; Reis: Kusumi *et al.*, 2004; Spinat: Azevedo *et al.*, 2006) und repräsentieren somit höchstwahrscheinlich gemeinsam die NEP-Aktivität. Eine Übersicht zur Verbreitung organellärer Phagentyp-RNA-Polymerasen in Algen und Pflanzen zeigt Abbildung 1.

1.2.2.3 Kernkodierte plastidäre RNA-Polymerase (NEP)

Schon 1971 wurde durch Ellis und Hartley aufgrund von Studien mit Translationsinhibitoren der cytoplasmatischen und plastidären Ribosomen vermutet, dass eine oder mehrere kernkodierte, plastidäre RNA-Polymerasen an der Transkription in Chloroplasten beteiligt sind. Studien an Plastiden aus hitzegebleichten, Ribosomen-defizienten Roggenblättern (Bünger und Feierabend, 1980; Falk *et al.*, 1993; Hess *et al.*, 1993), an weißem Gewebe der Gerstenmutante *albostrians* (Siemenroth *et al.*, 1981; Hess *et al.*, 1993) und an Ribosomen-freien Plastiden der *iojap* Maismutante (Han *et al.*, 1993) wiesen jeweils eine Transkriptionsaktivität in den Chloroplasten nach. Auch in der nicht-photosynthetischen, parasitären Pflanze *Epifagus virginiana* (Ems *et al.*, 1995), deren Plastom keine Gene für PEP-Untereinheiten kodiert, wurde RNA Synthese nachgewiesen. Diese Studien sowie Versuche mit PEP-defizienten Δrpo Tabakmutanten (Allison *et al.*, 1996; De Santis-MacIossek *et al.*, 1999; Krause *et al.*, 2000) deuteten auf eine NEP-Aktivität hin, da trotz des Fehlens einer funktionellen PEP Plastidengene transkribiert wurden. Dass es sich bei dieser kernkodierten Aktivität um eine Phagentyp-Polymerase handeln könnte, wurde deutlich, als Lerbs-Mache (1993) in transkriptionsaktiven Spinat-Chloroplastenpräparationen ein Protein von 110 kDa Größe nachwies, welches *in vitro* den T7-Phagenpromotor erkannte. Des Weiteren akkumulierten in Mutanten mit fehlender PEP-Aktivität Transkripte, deren Promotorregionen stark mitochondrialen Promotoren ähnelten (Allison *et al.*, 1996; Hajdukiewicz *et al.*, 1997; Kapoor *et al.*, 1997). Schließlich wurde in *A. thaliana* das nukleäre *RpoTp*-Gen identifiziert (Hedtke *et al.*, 1997; ursprünglich als RpoZ bezeichnet). Es folgten *RpoT*-Gene in weiteren Organismen wie beispielsweise Mais (Chang *et al.*, 1999), Weizen (Ikeda und Gray, 1999), Tabak (*N. silvestris*: Kobayashi *et al.*, 2001 und 2002; *N. tabacum*: Hedtke *et al.*, 2002), Gerste (Emanuel *et al.*, 2004) und *Physcomitrella patens* (Kabeya *et al.*, 2002; Richter *et al.*, 2002). Die Identifizierung dieser Sequenzen ermöglichte die Klonierung der RNAPs und die Identifizierung von Zielgenen dieses zweiten Transkriptionssystems in Plastiden.

Abbildung 2 stellt den typischen Aufbau der plastidenkodierten und der kernkodierten plastidären RNA-Polymerasen gegenüber.

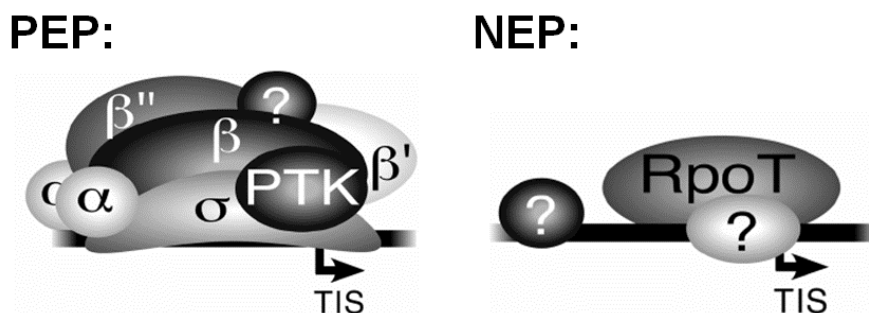


Abb. 2: Plastidäre RNA-Polymerasen. Die plastidärkodierte RNA-Polymerase (PEP) besteht aus den Untereinheiten 2α , β , β' und β'' und ist in reifen Chloroplasten mit verschiedenen kernkodierten Proteinen und einer Proteinkinase (*plastid transcription kinase*; PTK, Baginsky *et al.*, 1999; Ogrzewalla *et al.*, 2002) assoziiert. Die spezifische Promotorerkennung wird durch kernkodierte σ -Faktoren vermittelt. Die kernkodierte plastidäre RNA-Polymerase (NEP) besteht aus einem einzigen Polypeptid und assoziiert möglicherweise mit einem oder mehreren, bisher unbekannten Transkriptionsfaktoren. TIS = Transkriptionsinitiationsstelle. Modifiziert nach Liere und Börner, 2007.

1.2.3 Plastidäre Promotoren

Resultierend aus der Promotorcharakterisierung in PEP-defizienten Pflanzen (Hajdukiewicz *et al.*, 1997; Silhavy und Maliga, 1998; Hübschmann und Börner, 1998; Swiatecka-Hagenbruch *et al.*, 2007; Zhelyazkova *et al.*, 2012b) wurden plastidäre Gene hinsichtlich der Promotoren, an denen ihre Transkription initiiert wird, in drei Klassen unterteilt. Die Transkription von Photosynthesegenen erfolgt typischerweise an PEP-Promotoren (Klasse I). Allerdings werden bei Ausfall der PEP auch stromaufwärts von Photosynthesegenen NEP-Promotoren aktiviert (Zhelyazkova *et al.*, 2012b). Die meisten Haushaltsgene besitzen hingegen PEP- und NEP-Promotoren (Klasse II). Einige wenige Gene wie *accD*, welches für die β -UE der Acetyl-CoA-Carboxylase in Dikotylen kodiert, und das *rpoB/C1/C2* Operon, dass in allen höheren Pflanzen drei UEs der PEP kodiert, besitzen nach bisherigem Kenntnisstand ausschließlich einen NEP-Promotor (Klasse III; Hajdukiewicz *et al.*, 1997; Silhavy und Maliga, 1998; Swiatecka-Hagenbruch *et al.*, 2007; Zhelyazkova *et al.*, 2012b). Transkriptionsstartpunkte werden nachfolgend mit P (für Promotor) plus Genname und Position des Initiationsnukleotids in Bezug zum Translationsstartpunkt bzw. zur reifen rRNA angegeben.

1.2.3.1 PEP-Promotoren

Entsprechend ihrer endosymbiontischen, cyanobakteriellen Herkunft erkennt PEP aus höheren Pflanzen und Algen Variationen der typischen Konsensussequenzen -10 (5'-TATAaT-3') und -35 (5'-TTGaca-3') des *E. coli* σ^{70} -Promotortyps (Übersichten in Gruissem und Tonkyn,

1993; Liere und Maliga, 2001; Weihe 2004). Die funktionelle Ähnlichkeit der PEP-Promotoren zu den eubakteriellen -10/-35-Promotoren wurde durch die Erkennung plastidärer σ^{70} -Promotoren durch die *E. coli* RNA-Polymerase verdeutlicht (Gatenby *et al.*, 1981; Bradley und Gatenby, 1985; Boyer und Mullet, 1988; Eisermann *et al.*, 1990). Allerdings muss angemerkt werden, dass nicht alle durch PEP erkannten Promotoren die bakterientypische Struktur besitzen (Zhelyazkova *et al.*, 2012b). Einige PEP-Promotoren des σ^{70} -Typs enthalten regulatorische *cis*-Elemente. Zwischen den -10- und -35-Motiven des gut charakterisierten *psbA* Promotors wurde in Senf ein TATATA-Element gefunden, welches der TATA-Box nukleärer Gene ähnelt (Eisermann *et al.*, 1990; Link 1994). Dieses Motiv sowie die -10-Region reichten zur Erzeugung basaler Transkriptionslevel aus. Die -35-Region war notwendig um hohe Transkriptionsraten zu erhalten, wie sie typisch sind für Chloroplasten licht-adaptierter Pflanzen (Eisermann *et al.*, 1990; Link 1984). Auch der *psbA*-Promotor in Gerste enthält das TATATA-Motiv, jedoch war das -35-Motiv hier essentiell für eine *in vitro* Transkription (Kim *et al.*, 1999b). In Weizen wiederum war das TATATA-Motiv offenbar unwichtig für die Promotorerkennung. Allerdings wurde hier ein zusätzliches TGN-Motiv stromaufwärts des -10-Elements gefunden. In PEP aus reifen Chloroplasten der Blattspitze war diese erweiterte -10-Region ausreichend zur Promotorerkennung, wohingegen in jungen Plastiden aus der Blattbasis das -35-Element unerlässlich für die Transkription war (Bown *et al.*, 1997; Satoh *et al.*, 1999). Trotz der Konservierung der *psbA*-Promotorsequenzen werden die *cis*-Elemente unterschiedlich genutzt, was vermutlich auf die divergente Evolution von *trans*-Faktoren in diesen Spezies zurückzuführen ist. Weitere regulatorische Elemente, die in PEP-Promotoren höherer Pflanzen identifiziert wurden, sind beispielsweise die AAG-Box stromaufwärts des -35-Motivs im Weizen-*psbD*-Promotor (Kim *et al.*, 1999b) oder das RUA-Motiv stromaufwärts des -35-Elements im *rrn16*-Promotor (P1) in Tabak (Suzuki *et al.*, 2003; s. Abb. 3). Abhängig von der Spezies und dem Entwicklungsstadium haben die -10- und -35-Motive sowie die verschiedenen *cis*-Elemente eine unterschiedliche Bedeutung bei der Promotorerkennung, wobei Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle spielen.

PEP-Promotoren

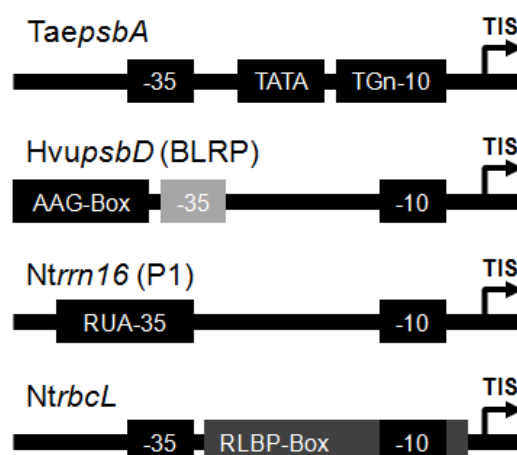


Abb. 3: Schematische Übersicht über verschiedene PEP-Promotoren. Dargestellt sind der *psbA*-Promotor aus Weizen (*TaepsbA*), der *psbD*-Promotor in Gerste (*HvupsbD*) sowie der *rrn16*- und *rbcL*-Promotor aus Tabak. Konservierte -10/-35-Motive, sowie spezielle Elemente wie die TATA-Box (Eisermann *et al.*, 1990), das erweiterte -10-Motiv (TGn; Satoh *et al.*, 1999), die AAG-Box (Kim *et al.*, 1999b), das RUA-Element (Suzuki *et al.*, 2003) und die RLBP-Binderegion (Kim *et al.*, 2002) sind gekennzeichnet. Die weniger konservierten Motive (-35 in *HvupsbD* und RLBP-Box) sind grau unterlegt. TIS = Transkriptionsinitiationsstelle. Nach Liere und Börner, 2007.

1.2.3.2 NEP-Promotoren

In grünen Chloroplasten sind NEP-Transkripte meist kaum detektierbar (Maliga 1998; Hess und Börner 1999; Liere und Maliga, 2001). Daher wurden NEP Transkriptionsinitiationstellen in Systemen mit reduzierter oder fehlender PEP-Aktivität identifiziert wie z.B. der Gerstenmutante *albostrians* (Hübschmann und Börner, 1998; Zhelyazkova *et al.*, 2012b), der Maismutante *iojap* (Silhavy und Maliga, 1998), Δ *rp**o*-Tabakmutanten (Allison *et al.*, 1996; Hajdukiewicz *et al.*, 1997; Serino und Maliga, 1998) und Suspensionskulturen von photosynthetisch-inaktivem Tabak, *Arabidopsis* und Reis (Kapoor *et al.*, 1997; Miyagi *et al.*, 1998; Swiatecka-Hagenbruch *et al.*, 2007). NEP-Promotoren unterscheiden sich signifikant von PEP-Promotoren und ähneln den Promotoren pflanzlicher Mitochondrien (Bohne *et al.*, 2007). Sie können entsprechend konservierter Sequenzmotive in mindestens drei Typen unterteilt werden (Übersichten in Liere und Maliga, 2001; Liere und Börner 2007; s. Abb. 4). Typ-Ia NEP-Promotoren besitzen in Mono- und Dikotylen ein hochkonserviertes YRTa-Motiv innerhalb einer weniger konservierten AT-reichen Sequenz von ca. 10 Nukleotiden Länge (-15/+5), welches unmittelbar vor der Transkriptionsinitiationstelle (+1) liegt (*PatpB*-289: Kapoor und Sugiura, 1999; Xie und Allison, 2002; *PaccD*-129 und *PrpoB*-345: Liere und Maliga, 1999a und b). NEP-Promotoren vom Typ-Ib haben 10-20 Nukleotide stromaufwärts vom YRTa-Motiv als zusätzliches, konserviertes Element eine GAA-Box (ATAN₀₋₁GAA), deren Rolle bei der Promotorerkennung für den Tabakpromotor *PatpB*-289

gezeigt wurde (Kapoor und Sugiura, 1999; Xie und Allison, 2002). Typ-II NEP-Promotoren haben kein YRTa-Motiv. Stattdessen wird die Transkriptionsinitiation durch eine konservierte Sequenz zwischen den Positionen -5 bis +25 vermittelt. Als einziges Beispiel für diesen *non-consensus* Promotortyp in Dikotylen wurde bisher der Promotor des Gens *clpP*, welches für die proteolytische UE der ClpP Protease kodiert, charakterisiert (*PclpP*-53 aus Tabak: Sriraman *et al.*, 1998a). Das *clpP*-Promotormotiv ist konserviert in Mono- und Dikotylen, Koniferen und Lebermoosen. Demnach hat sich das NEP-Transkriptionssystem schon früh in der Evolution entwickelt. Allerdings wird das *PclpP*-53-Motiv in Reis und *Chlamydomonas reinhardtii* nicht als Promotor genutzt, was vermutlich auf das Fehlen von Spezifitätsfaktoren bzw. der notwendigen NEP-Aktivität zurückzuführen ist, da z.B. RpoTmp in Monokotylen nicht vorkommt (Sriraman *et al.*, 1998a; Liere *et al.*, 2004). Schließlich wurde in Spinat, Senf und *Arabidopsis* ein weiterer Promotor ohne YRTa-Motiv stromaufwärts des *rrn*-Operons identifiziert (Baeza *et al.*, 1991; Iratni *et al.*, 1994 und 1997; Pfannschmidt und Link, 1997; Sriraman *et al.*, 1998a; Swiatecka-Hagenbruch *et al.*, 2007). Dieser sogenannte Pc-Promotor initiiert die Transkription an einem Nukleotid zwischen der -10- und -35-Region des *rrn*-PEP-Promotors.

NEP-Promotoren

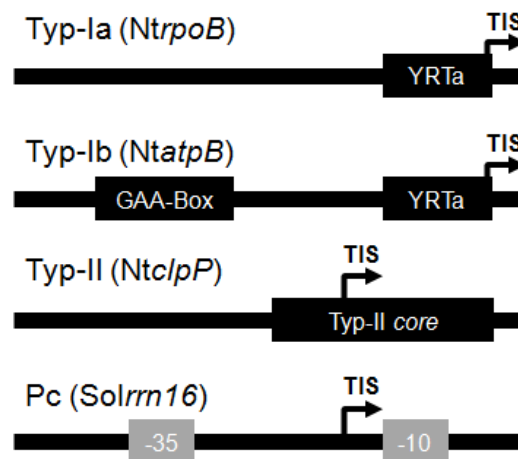


Abb. 4: Schematische Übersicht über verschiedene Typen von NEP-Promotoren. Gezeigt ist der typische Aufbau von Typ-I, Typ-II und Pc NEP-Promotoren aus Tabak (Nt) und Spinat (Sol). Die korrespondierenden Gene sind in Klammern angegeben. Das YRTa- Motiv sowie die GAA-Box sind gekennzeichnet (Hübschmann und Börner, 1998; Kapoor und Sugiura, 1999; Liere und Maliga, 1999a). TIS = Transkriptionsinitiationsstelle. Nach Liere und Börner, 2007.

Während in anderen Spezies wie Tabak und Gerste die zudem in der *rrn*-Promotorregion vorhandenen σ^{70} -Elemente als Promotor genutzt werden und der Pc-Promotor ungenutzt bleibt (Allison *et al.*, 1996; Hübschmann und Börner, 1998; Silhavy und Maliga, 1998),

erfolgt in Spinat die Transkription ausschließlich vom Pc-Promotor. Hierbei spielt möglicherweise der DNA-bindende Faktor CDF2 eine entscheidende Rolle. Während CDF2-A die Transkriptionsinitiation am PEP-Promotor hemmt, interagiert CDF2-B mit der NEP-2 Aktivität und initiiert so die Transkription am Pc-Promotor (Bligny *et al.*, 2000). In *Arabidopsis* wird der Pc-Promotor in frühen Entwicklungsstadien von RpoTmp genutzt, während in reifen Chloroplasten PEP die Transkription des *rrn*-Operons übernimmt (Courtois *et al.*, 2007). Abschließend muss erwähnt werden, dass kürzlich auch in Gerstenplastiden eine Reihe von NEP-Promotoren entdeckt wurde, denen das YRTa-Motiv fehlt (Zhelyazkova *et al.*, 2012b).

1.2.3.3 Interne Promotoren von tRNAs

Die meisten plastidären tRNAs werden von PEP an σ^{70} -ähnlichen Promotoren transkribiert. Für einige tRNAs jedoch scheint die Transkription von internen Promotoren aus zu erfolgen, so z.B. für *trnS*, *trnR* und *trnT* aus Spinat (Gruissem *et al.*, 1986; Cheng *et al.*, 1997), für *trnS*, *trnH* und *trnR* aus Senf (Neuhaus und Link, 1990; Nickelsen und Link, 1990; Liere und Link, 1994), und für *trnE* aus *Chlamydomonas* (Jahn, 1992). Die Transkription von *trnS* aus Spinat wird beispielsweise 12 Nukleotide stromaufwärts der kodierenden Region initiiert (Wu *et al.*, 1997). In *in vitro* Transkriptionsassays genügte die kodierende Region um basale Transkriptionslevel zu erhalten. Wildtypische Level wurden durch Einbeziehen einer AT-reichen Sequenz -31 bis -11 stromaufwärts der kodierenden Sequenz erzielt. Allerdings wurden in diesem Bereich keine Sequenzen gefunden, die NEP- oder PEP-Promotoren entsprechen. Stattdessen enthält die kodierende Region von *trnS* wie die meisten tRNAs Sequenzen mit Ähnlichkeiten zu den A- und B-Boxen nukleärer tRNA-Promotoren (Galli *et al.*, 1981; Geiduschek *et al.*, 1995). Möglicherweise werden plastidäre tRNA-Gene von spezialisierten NEP und/oder PEP Enzymen transkribiert, die hierfür spezielle Transkriptionsfaktoren zur Promotorerkennung rekrutieren.

1.2.4 Transkriptionsfaktoren plastidärer RNA-Polymerasen

1.2.4.1 Spezifitätsfaktoren für PEP

Wie in Eubakterien sind auch in höheren Pflanzen und Algen kernkodierte Sigmafaktoren für die Transkription von Genen mit -10/-35-Promotoren von Bedeutung. Als Kofaktoren der PEP ermöglichen sie die spezifische Promotorerkennung und vermitteln das Aufschmelzen der DNA um die Transkriptionsinitiationsstelle (Übersichten in Allison, 2000; Liere und Börner, 2007; Lysenko, 2007). Zunächst gelang der biochemische und immunologische Nachweis von Sigma-Aktivitäten in z.B. *Chlamydomonas*, Spinat, Senf, Mais und Reis

(Surzycki und Shellenbarger, 1976; Lerbs *et al.*, 1983; Bülow und Link, 1988; Troxler *et al.*, 1994). Mittlerweile wurden entsprechende Gene für Sigmafaktoren identifiziert und für Organismen wie *Arabidopsis*, Tabak, Senf, Mais, Reis, Weizen und *Physcomitrella* charakterisiert (Übersicht in Allison, 2000). Die N-Termini dieser σ -Faktoren zeigen typische Sequenzen für Transitpeptide zur plastidären Lokalisation, welche *in vivo* mittels GFP-Fusionen nachgewiesen wurde (Isono *et al.*, 1997b; Tanaka *et al.*, 1997; Kanamaru *et al.*, 1999; Fujiwara *et al.*, 2000; Lahiri und Allison, 2000; Oikawa *et al.*, 2000; Hara *et al.*, 2001). Für einige Sigmafaktoren wurde interessanterweise auch eine mitochondriale Lokalisation gezeigt (Beardslee *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2003). Die funktionelle Charakterisierung zahlreicher, pflanzlicher Sigmafaktoren erfolgte sowohl *in vitro* durch Rekonstitutions- und Transkriptionsexperimente mit rekombinanten Proteinen und der *E. coli* RNA-Polymerase (Kestermann *et al.*, 1998; Hakimi *et al.*, 2000; Beardslee *et al.*, 2002; Homann und Link, 2003; Privat *et al.*, 2003), als auch anhand von *knockout* Mutanten, überexprimierenden Pflanzen und *anti-sense* Linien (Übersicht in Schweer, 2010).

Neben den Sigmafaktoren haben auch andere Faktoren einen Einfluss auf die Transkription durch PEP, beispielsweise CDF2 (s. 1.2.4.2) oder auch die Proteine CSP41a und b aus *Arabidopsis*. Während CSP41a RNA bindet und schneidet (Bollenbach *et al.*, 2003), wird CSP41b mit CSP41a, Ribosomen und PEP gereinigt (Pfannschmidt *et al.*, 2000; Raab *et al.*, 2006). Allerdings deuten neuere Daten darauf hin, dass CSP41b nicht stabil mit PEP und den Ribosomen assoziiert ist (Qi *et al.*, 2012). Beide Proteine könnten eine generelle Funktion bei der Transkription und Translation, sowie eine spezielle Rolle bei der Expression des *atpB*-Operons haben (Bollenbach *et al.*, 2009). Des Weiteren wird den CSP41 Komplexen eine Funktion bei der Stabilisierung bestimmter Transkripte insbesondere bei Dunkelheit zugeschrieben (Qi *et al.*, 2012).

1.2.4.2 Spezifitätsfaktoren der Phagentyp-RNA-Polymerasen

Die Identifizierung von Transkriptionsfaktoren pflanzlicher Phagentyp-Polymerasen stellt sich bislang als schwierig heraus. Für die homologen Proteine der pflanzlichen RpoTm aus *S. cerevisiae* (Schinkel *et al.*, 1987; Jang und Jaehning, 1991), *X. laevis* (Antoshechkin und Bogenhagen, 1995; Bogenhagen, 1996) und *H. sapiens* (Fisher und Clayton, 1988) wurden bereits akzessorische Proteine identifiziert. Diesen Transkriptionsfaktoren (in Hefe: Mtf1 bzw. sc-mtTFB; im Menschen: h-mtTFB1 und 2) wurde ursprünglich eine Funktion bei der Promotorerkennung zugeordnet, während neuere Erkenntnisse in der Hefe zeigten, dass die Promotorspezifität von RNAP selbst bewerkstelligt wird und die Hilfsfaktoren vermutlich an

der Formation oder Stabilisierung des offenen Promotorkomplexes beteiligt sind (Matsunaga und Jaehning, 2004; Nayak *et al.*, 2009). Ähnlich wurde für die *Arabidopsis*-Enzyme RpoTp und RpoTm *in vitro* gezeigt, dass sie an einer Reihe mitochondrialer und plastidärer Promotoren ohne Co-Faktoren die Transkription initiierten (Kühn *et al.*, 2007). Allerdings erfolgte die Transkription nur an superhelikaler und nicht an linearer DNA. Des Weiteren wurden einige Promotoren nicht erkannt, und RpoTm zeigte keinerlei signifikante Promotorspezifität (Kühn *et al.*, 2007). Dadurch wurde deutlich, dass die *Arabidopsis* RpoTs *in organello* Spezifitätsfaktoren benötigen. Als potentielle Kandidaten kommen pflanzliche Proteine mit Ähnlichkeit zu den in Hefe und Mensch bekannten Faktoren in Frage. Dies sind zum einen mtTFB, welcher zu einer Familie von RNA-Methyltransferasen gehört (Falkenberg *et al.*, 2002; McCulloch *et al.*, 2002; Rantanen *et al.*, 2003), und zum anderen mtTFA, welcher zur HMG Familie (*high mobility group*) gehört und für die Transkription nicht essentiell ist, aber sie zumindest stimuliert (Xu und Clayton, 1992; Jaehning, 1993; Parisi *et al.*, 1993). In *Arabidopsis* wurden einige ORFs, die Methyltransferase-ähnliche Proteine kodieren, identifiziert. Für eines der Genprodukte (MetA; At5g66360) wurde zwar eine mitochondriale Lokalisation nachgewiesen, dennoch deuteten weder *in vitro* Transkriptionsversuche noch Analysen einer entsprechenden Mutante auf eine Funktion bei der Transkription hin (Richter *et al.*, 2010). Das TFB-ähnliche Protein PFC1 (At1g01860; Tokuhiya *et al.*, 1998) stellt eine plastidäre Methyltransferase dar. Der Phenotyp korrespondierender *knockout* Mutanten weist aber nicht auf eine Rolle als Transkriptionsfaktor für NEP hin (Swiatecka-Hagenbruch *et al.*, unveröffentlichte Daten).

Aus Weizenmitochondrien wurde ein 63 kDa großes Protein identifiziert, welches *in vitro* die Transkription des *cox2*-Promotors stimulierte (Ikeda und Gray, 1999). Da es sich bei diesem Protein um ein PPR-Protein handelt, ist es jedoch eher an posttranskriptionellen Prozessen beteiligt (Lurin *et al.*, 2004). Außerdem wurde für drei homologe Proteine in *Arabidopsis* gezeigt, dass sie mitochondriale Promotoren nur unspezifisch binden und nicht mit RpoTm interagieren (Richter *et al.*, 2010; Kühn *et al.*, 2007 und unveröffentlichte Daten).

Aus Erbsenmitochondrien wurden zwei Proteine isoliert, die an den *atp9*-Promotor binden. Für eines der Proteine wurde bereits gezeigt, dass es Ähnlichkeit zu einem Enzym des Leucin-Katabolismus hat (Däschner *et al.*, 2001). Für das andere, 32 kDa große Protein steht eine Charakterisierung der Funktion aus.

In Spinat-Chloroplasten wird das *rrn*-Operon vom sogenannten Pc-Promotor aus transkribiert (s. 1.2.3.2). Als potentieller Regulator ist das DNA-bindende Protein CDF2 bekannt, dessen eine Form CDF2-A die Transkription durch PEP am P1-Promotor hemmt, während CDF2-B

die Initiation durch die bisher unbekannte NEP-2-Aktivität am Pc-Promotor stimuliert (Bligny *et al.*, 2000). Bei NEP-2 handelt es sich vermutlich um RpoTmp, für die eine plastidäre Lokalisation in Spinat bekannt ist (Azevedo *et al.*, 2006) und für die in *Arabidopsis* bereits gezeigt wurde, dass sie für die Transkription des *rrn*-Operons vom Pc-Promotor verantwortlich ist (Courtois *et al.*, 2007).

Interessanterweise wurde für einige Sigmafaktoren neben der chloroplastidären auch eine mitochondriale Lokalisation beobachtet (AthSig5: Fujiwara *et al.*, 2000; Yao *et al.*, 2003; AthSig1: Tandara und Liere, unveröffentlichte Daten; ZmaSig2B: Beardslee *et al.*, 2002). Sig2 aus Mais wurde zudem mit RpoTm biochemisch gereinigt und könnte daher tatsächlich eine Rolle bei der mitochondrialen Transkription spielen.

Insgesamt wurden bisher keine Faktoren identifiziert, die an der spezifischen Promotorerkennung und der Transkriptionsinitiation durch NEP bzw. die Phagentyp-RNA-Polymerasen in Pflanzen beteiligt sind, und deren transkriptionsstimulierende oder -hemmende Wirkung eindeutig nachgewiesen wurde.

1.2.5 Regulation der plastidären Genexpression

Die Expression von kernkodierten, plastidenlokalisierten Genprodukten wird auf transkriptionaler Ebene reguliert (Kuhlemeier, 1992). Demgegenüber erfolgt die Regulation plastidärer Gene vor allem posttranskriptionell durch RNA-Prozessierung, bei der Translation und durch postrtranslationale Modifikation (Deng und Grusis, 1987; Barkan und Goldschmidt-Clermont, 2000; Monde *et al.*, 2000; Stern *et al.*, 2010). Doch auch die Transkriptionsaktivität von Plastidengen wird moduliert durch exogene und endogene Faktoren wie Licht, Temperatur, Plastidentyp und Chloroplasten-Entwicklungsstadium (Rapp *et al.*, 1992; Mullet, 1993; Link, 1996; Liere und Börner, 2007). Dabei werden Veränderungen von Umweltbedingungen durch die Interaktion verschiedener, spezifischer Faktoren wie beispielsweise der Sigmafaktoren mit den katalytischen Komponenten der RNAPs vermittelt. Allerdings sind entsprechende regulatorische Komponenten und Modifikationen bisher nur für PEP bekannt.

Eine wichtige Rolle bei der Regulation der plastidären Transkription spielen Lichtbedingungen. Die Differenzierung des Proplastiden zum Chloroplasten erfolgt lichtinduziert. Um einen schnellen Aufbau des Photosynthesapparates zu gewährleisten steigt schon im frühen Stadium der lichtinduzierten Entwicklung von Pflanze und Chloroplast die Transkriptionsaktivität der meisten plastidären Gene an. Des Weiteren erfolgt eine lichtabhängige Transkription vieler Plastidengene auch in ergrünenden und reifen Blättern

(Greenberg *et al.*, 1989; Schrubar *et al.*, 1990; Baumgartner *et al.*, 1993; DuBell und Mullet, 1995; Hoffer und Christopher, 1997; Shiina *et al.*, 1998; Satoh *et al.*, 1999; Chun *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2003). Dies betrifft sowohl Photosynthese- als auch Haushaltsgene (*psbA*: Klein und Mullet, 1990; *psbD-psbC*: Sexton *et al.*, 1990; *rbcL* und *atpB*: Isono *et al.*, 1997a). Auch die Expression der meisten plastidären Sigmafaktoren ist lichtabhängig und wird in frühen Entwicklungsstadien und in Abhängigkeit vom circadianen Rhythmus differentiell reguliert (Kanamuru *et al.*, 1999; Oikawa *et al.*, 2000; Homann und Link, 2003; Privat *et al.*, 2003). Dies korreliert mit der prominenten Rolle von PEP gegenüber NEP in photosynthetisch aktiven Chloroplasten. Verschiedene Lichtqualitäten werden in höheren Pflanzen durch spezielle Photorezeptoren, die Phytochrome und Cryptochrome, detektiert (Chun *et al.*, 2001; Thum *et al.*, 2001). Dabei ist die durch die Cryptochrome vermittelte Rezeption von Blaulicht von entscheidender Bedeutung für die Aktivierung plastidärer Transkription in an Dunkelheit adaptierten Blättern. Grünlicht könnte dabei eine ausgleichende bzw. antagonistische Rolle zum Blaulicht spielen (Dhingra *et al.*, 2006). Auch die Expression der *RpoT*-Gene wird in unterschiedlichem Maße durch Licht beeinflusst. Experimente mit etiolierten *Arabidopsis*-Keimlingen, die monochromatischem Rot-, Blau- und Grünlicht ausgesetzt wurden, zeigten beispielsweise eine schnelle Induktion der *RpoT*-Transkriptakkumulation durch rotes und blaues Licht (Borsellino, 2012).

Neben den Lichtbedingungen hängt die Transkriptionsaktivität in Chloroplasten auch vom circadianen und diurnalen Rhythmus, vom Redoxstatus und von der Signaltransduktion vom Plastiden zum Nukleus ab, welche z.B. Auskunft über das Entwicklungsstadium des Plastiden gibt (Übersichten in Liere und Börner, 2007; Liere *et al.*, 2011).

1.2.5.1 Die Rolle der RpoTs und Arbeitsteilung zwischen NEP und PEP

Die Transkription in den Mitochondrien erfolgt durch eine Phagentyp-Polymerase. In Monokotyledonen ist dies RpoTm. In Dikotylen wird auch RpoTmp in die Mitochondrien importiert. Die Untersuchung der entwicklungs- und gewebeabhängigen Expression dieser Enzyme in *Arabidopsis* zeigte ein überlappendes Expressionsmuster. RpoTm und RpoTmp wurden vor allem in meristematischen und mitochondrienreichen Geweben exprimiert. Daraus wurde geschlossen, dass RpoTm und RpoTmp unterschiedliche, mitochondriale Promotoren erkennen (Emanuel *et al.*, 2006). Allerdings beobachteten Baba *et al.* (2004) in *Arabidopsis*-Mutanten mit einer T-DNA-Insertion im RpoTmp-Gen, dass sich die mitochondriale Transkriptakkumulation nicht signifikant veränderte, jedoch die Abundanz plastidärer Transkripte. Dies sprach gegen eine Erkennung verschiedener Promotoren durch

RpoTm und RpoTmp und ließ darauf schließen, dass RpoTmp vor allem eine Rolle bei der Transkription plastidärer Gene in frühen Entwicklungsstadien spielt. Für beide mitochondriale RNAPs wurde die RNA-Polymerase-Aktivität nachgewiesen, die spezifische Erkennung mitochondrialer Promotoren konnte in *in vitro* Transkriptionsassays aber nur für rekombinante RpoTm und nicht für RpoTmp gezeigt werden (Kühn *et al.*, 2007). Kühn *et al.* (2009) zeigten in Studien mit *RpoTmp*-Mutanten von *Arabidopsis* schließlich, dass RpoTmp für die Transkription spezieller Mitochondriengene von Bedeutung ist. Die Aktivität der Polymerase schien dabei eher genspezifisch als promotorspezifisch zu sein. Während RpoTm also die generelle Polymerase in Mitochondrien darstellt, erfüllt RpoTmp offenbar eine unterstützende Funktion bei der Expression einiger spezieller Gene wie *nad6* und *cox1*.

In den Chloroplasten teilen sich PEP und NEP die Aufgaben bei der Transkription. Tatsächlich sind in allen bisher untersuchten Plastidentypen - also Chloroplasten, Etioplasten, Amyloplasten und Chromoplasten - NEP und PEP aktiv (Tiller und Link, 1993; Isono *et al.*, 1997a; Baginsky *et al.*, 2004; Wurbs *et al.*, 2007; Barsan *et al.*, 2010). Einige Photosynthesegene werden nur von PEP transkribiert, woraus folgt, dass PEP schon in frühen Stadien der Chloroplastenentwicklung aktiv sein muss. Tatsächlich befinden sich bereits in den noch nicht photosynthetisch aktiven Plastiden der Samen von *Arabidopsis* und Spinat PEP-Moleküle und es wurde beobachtet, dass die Aktivität dieser PEP wichtig für eine effiziente Keimung ist (Demarsy *et al.*, 2006). Des Weiteren erfolgt für wenige Haushaltsgene die Transkription ausschließlich durch NEP. Dazu gehören beispielsweise *accD* und *rpoB* (Hajdukiewicz *et al.*, 1997; Silhavy und Maliga, 1998; Swiatecka-Hagenbruch *et al.*, 2007). Da die Expression dieser Gene während der gesamten Blattentwicklung von Bedeutung ist, muss folglich auch NEP zu allen Zeitpunkten der Entwicklung aktiv sein und ausreichend Transkripte zur Verfügung stellen. Ein besonders interessantes Beispiel ist das *rpoB/C1/C2* Operon, welches drei der vier UEs des PEP *core* Enzyms kodiert. Somit wird nicht nur die Aktivität von PEP mittels Sigmafaktoren durch den Nukleus gesteuert, sondern es hängt auch die Abundanz der plastidenkodierten RNAP von einer kernkodierten Komponente ab. Die meisten plastidären Haushaltsgene besitzen sowohl NEP- als auch PEP-Promotoren. Dies sind typischerweise Gene, die während der gesamten, plastidären Entwicklung transkribiert werden müssen (Maliga, 1998; Liere und Maliga, 2001; Liere und Börner, 2007; Swiatecka-Hagenbruch *et al.*, 2007). Das spricht für eine differentielle Expression durch beide Promotortypen während der Entwicklung, wobei die Transkription in jungen, nicht-grünen Geweben vorrangig von NEP-Promotoren ausgeht und mit der Entwicklung reifer, photosynthetisch aktiver Chloroplasten von PEP-Promotoren erfolgt (Baumgartner *et al.*,

1993; Hajdukiewicz et al., 1997; Kapoor et al., 1997; Emanuel et al., 2004; Zoschke *et al.*, 2007). So wurde für das *rrn*-Operon in *Arabidopsis* gezeigt, dass dieses während der Keimung und frühen Pflanzenentwicklung von RpoTmp transkribiert wird. In der späteren Entwicklung übernimmt dann PEP die Transkription (Courtois *et al.*, 2007). Dieses einfache Modell der sequentiellen Arbeitsteilung muss jedoch erweitert werden. Makroarray-Analysen in *Arpo* Tabakmutanten zeigten z.B., dass neben der selektiven Promotornutzung auch posttranskriptionelle Prozesse das Transkriptmuster in Plastiden determinierten (Krause *et al.*, 2000; Legen *et al.*, 2002). Zudem wurde in Mais gezeigt, dass sich zwar die Abundanz von NEP in reifen Chloroplasten verringerte, jedoch die Transkriptionsaktivität zunahm und die NEP-Transkriptstabilität abnahm (Cahoon et al., 2004). Demgegenüber stieg in reifen Plastiden die PEP-Aktivität und die Stabilität der resultierenden Transkripte stieg bzw. blieb konstant. In Mais schien sich demnach die Akkumulation von NEP-abhängigen Transkripten im Laufe der Entwicklung wenig zu ändern, während die Akkumulation PEP-abhängiger Transkripte zunahm. Für andere Spezies konnte ein derartiger Zusammenhang zwischen transkribierendem Enzym und Transkriptakkumulation nicht gezeigt werden. Weiterhin bleibt zu klären, wie ein Wechsel von NEP-Aktivität zu PEP-Aktivität im Verlauf der Chloroplastendifferenzierung in den Plastiden gesteuert werden könnte. In Spinat wurden die sogenannten NIPs (*NEP interacting proteins*) identifiziert (Azevedo *et al.*, 2008). Diese in der Thylakoidmembran integralen Proteine werden lichtinduziert exprimiert, interagieren mit RpoTmp und binden das Enzym so an der Membran. Ob jedoch eine Assoziation mit der Membran gleichzusetzen ist mit einer Inaktivierung von RpoTmp (Azevedo *et al.*, 2008), bleibt fraglich, insbesondere, da der plastidäre Transkriptionsapparat und die plastidäre DNA ebenfalls an die Membran gebunden sind (Sato, 2001; Sato *et al.*, 2003; Schweer *et al.*, 2010). In einem weiteren Modell für den Wechsel von NEP- zu PEP-Aktivität wurde der tRNA^{Glu} in *Arabidopsis* Bedeutung beigemessen. Hanaoka *et al.* (2005) zeigten eine Bindung dieser tRNA an rekombinante RpoTp. Zudem beobachteten sie in *in vitro* Transkriptionsexperimenten eine Inhibition der Transkription von *accD* bei Zugabe von tRNA^{Glu}. Allerdings zeigten neuere Experimente eine eher unspezifische Bindung von tRNA^{Glu} sowie auch anderen tRNAs an alle drei RpoTs (Bohne *et al.*, 2009). Da außerdem die NEP-Aktivität während der Chloroplastenreifung nicht herabreguliert wird (Cahoon *et al.*, 2004; Zoschke *et al.*, 2007), ist eine Rolle dieser speziellen tRNA bei der Regulation der NEP-Aktivität unwahrscheinlich. Neben der Frage nach der Bedeutung von NEP gegenüber PEP ist auch die Aufgabenteilung zwischen RpoTp und RpoTmp in den Plastiden von Interesse. In RpoTmp-T-DNA-Insertionslinien von *Arabidopsis* war die Abundanz plastidärer

Transkripte verändert und die Mutanten zeigten ein verzögertes Ergrünen (Baba *et al.*, 2004). Daraus wurde geschlossen, dass RpoTmp in der frühen Entwicklung des Keimlings wichtig ist und RpoTp in späteren Entwicklungsstadien die Transkription an NEP-Promotoren übernimmt. Da in *Arabidopsis* eine Doppelmutation von RpoTp und RpoTmp schon früh in der Keimung letal wirkte, wurde auf teilweise redundante Funktionen der beiden Enzyme geschlossen (Hricová *et al.*, 2006). Studien mit transgenem Tabak, welcher RpoTp überexprimierte, zeigten eine verstärkte Nutzung von Typ-I NEP-Promotoren, jedoch nicht vom Typ-II NEP-Promotor des *clpP*-Gens (Liere *et al.*, 2004). Schließlich wurde durch *primer extension* Analysen in *Arabidopsis* deutlich, dass RpoTp für die Transkription von *accD*, *rpoB* und *clpP* verantwortlich war und RpoTmp offenbar am Pc-Promotor des *rrn*-Operons die Transkription initiierte (Courtois *et al.*, 2007; Swiatecka-Hagenbruch *et al.*, 2008). Somit gilt RpoTp als prinzipielle NEP-Aktivität, während RpoTmp offenbar spezielle Aufgaben wie z.B. die Transkription von *rrn16* erfüllt.

1.3 Zielstellung der Arbeit

Während nur wenige Gene wie *rpoB* und *accD* ausschließlich durch NEP transkribiert werden, besitzen die meisten Haushaltsgene Promotoren für NEP und PEP. Darüberhinaus scheinen einige NEP-transkribierte Gene nur zu bestimmten Zeitpunkten der Chloroplastenreifung exprimiert zu werden, wohingegen andere während der gesamten Blattentwicklung transkribiert werden. Ähnliches gilt auch für PEP-transkribierte Gene, welche sowohl entwicklungs- oder auch lichtabhängig, sowie konstitutiv exprimiert werden. In der vorliegenden Arbeit sollte anhand von Promotorveränderungen bzw. -austauschen untersucht werden, ob die plastidäre Transkription während der Chloroplastendifferenzierung durch den Polymerasetyp reguliert wird, und ob der jeweils genutzte Polymerasetyp einen Einfluss auf die Transkriptstabilität und -prozessierung, sowie Proteinlevel hat. Dafür sollten transplastomische Tabakpflanzen hergestellt werden, in denen die NEP-Promotoren von *accD*, *rpoB* und *clpP1* gegen einen PEP-Promotor ausgetauscht werden und die NEP-Promotoren von *accD*, *rrn16* und *clpP1* durch Mutagenese ausgeschaltet bzw. geschwächt werden. Ebenso sollte der PEP-Promotor des an der Chlorophyllbiosynthese beteiligten *trnE*-Gens durch einen NEP-Promotor ersetzt werden. Für die resultierenden, transplastomischen Linien sollten dann die veränderte Promotornutzung durch *primer extension* Analysen sowie dRNA-Seq (Illumina Sequenzierung) nachgewiesen und eventuell vorhandene, alternative Promotoren identifiziert werden. Des Weiteren sollten für die jeweils manipulierten Gene

Transkript- und Proteinmengen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Blattentwicklung analysiert werden. Diese Versuche sollten Aufschluss darüber geben, ob PEP in verschiedenen Entwicklungsstadien die Funktion von NEP ersetzen kann und der Verlust bestimmter NEP-Promotoren einen signifikanten Effekt während der Pflanzenentwicklung hat.

Vergangene Studien deuten darauf hin, dass die Phagentyp-RNA-Polymerasen *in organello* Spezifitätsfaktoren zur Promotorerkennung und Transkriptionsinitiation benötigen. Daher sollten in dieser Arbeit potentielle Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Dafür sollten RpoTp und RpoTmp aus Tabak und *Arabidopsis* zum einen heterolog mit verschiedenen, N-terminalen Epitopen exprimiert, gereinigt und für *pulldown assays* verwendet werden. Zum anderen sollten bereits vorhandene Tabakpflanzen, die RpoTp mit unterschiedlichen Affinitäts-tags *in vivo* exprimieren, zur Co-Immunopräzipitation eingesetzt werden, sowie entsprechende tag-RpoT-exprimierende *Arabidopsis*-Pflanzen hergestellt werden. Diese *Arabidopsis*-Pflanzen sollten außerdem genutzt werden, um Effekte der Überexpression auf RNA- und Proteinebene zu analysieren, mit den RpoTs assoziierte RNAs mittels RIP-Chip zu identifizieren, und die organelläre und subplastidäre Lokalisation von RpoTp und RpoTmp zu bestimmen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Materialien und Anbieter

Alle verwendeten Chemikalien und Biochemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Roth, Merck, Serva, und Sigma bezogen, Radiochemikalien von Perkin Elmer und Hartmann Analytics, Enzyme von Fermentas, NEB und Qiagen und Desoxy- und Ribonukleosidtriphosphate von Fermentas. Sonstige Anbieter sind im Anhang in Tabelle A3 aufgeführt.

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden mit Reinstwasser (USF Purelab Ultra System) hergestellt. Gegebenenfalls erfolgte deren Sterilisation sowie die Inaktivierung gentechnisch veränderter Organismen (GVO) in einem Dampfsterilisator Varioklav 75S (Thermo Fisher) bei 120 °C und 55 kPa für 20 Minuten.

2.1.2 Pflanzenmaterial

Für die Herstellung transplastomischer Tabakpflanzen wurde *Nicotiana tabacum* des Ökotyps Petit Havana verwendet. Für die Herstellung transgener *Arabidopsis*-Pflanzen wurde *Arabidopsis thaliana* des Ökotyps Columbia (Col-0) genutzt.

Die transgenen Pflanzen sind mit ihren Eigenschaften in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: Übersicht über die transgenen Pflanzen

Bezeichnung	Organismus; Charakterisierung	Referenz
3xFLAG-RpoTp	<i>A. thaliana</i> ; konstitutive <i>in vivo</i> Expression 3xFLAG-Epitop-markierter RpoTp	Diese Arbeit
FLAG-HA-RpoTp	<i>A. thaliana</i> ; konstitutive <i>in vivo</i> Expression FLAG-HA-Epitop-markierter RpoTp	Diese Arbeit
3xHA-RpoTp	<i>A. thaliana</i> ; konstitutive <i>in vivo</i> Expression 3xHA-Epitop-markierter RpoTp	Diese Arbeit
3xFLAG-RpoTmp	<i>A. thaliana</i> ; konstitutive <i>in vivo</i> Expression 3xFLAG-Epitop-markierter RpoTmp	Diese Arbeit
FLAG-HA-RpoTmp	<i>A. thaliana</i> ; konstitutive <i>in vivo</i> Expression FLAG-HA-Epitop-markierter RpoTmp	Diese Arbeit
3xHA-RpoTmp	<i>A. thaliana</i> ; konstitutive <i>in vivo</i> Expression 3xHA-Epitop-markierter RpoTmp	Diese Arbeit
3xFLAG-RpoTm	<i>A. thaliana</i> ; konstitutive <i>in vivo</i> Expression 3xFLAG-Epitop-markierter RpoTm	Diese Arbeit
FLAG-HA-RpoTm	<i>A. thaliana</i> ; konstitutive <i>in vivo</i> Expression FLAG-HA-Epitop-markierter RpoTm	Diese Arbeit
3xHA-RpoTm	<i>A. thaliana</i> ; konstitutive <i>in vivo</i> Expression 3xHA-Epitopmarkierter RpoTm	Diese Arbeit
$\Delta rpoA$	<i>N. tabacum</i> ; Insertion von <i>aadA</i> in <i>rpoA</i>	Serino und Maliga, 1998
<i>PatpB</i> -255:: <i>accD</i>	<i>N. tabacum</i> ; <i>PaccD</i> -129 ersetzt durch <i>PatpB</i> -255	Diese Arbeit
$\Delta PaccD$ -129:: <i>accD</i>	<i>N. tabacum</i> ; <i>PaccD</i> -129 <i>knock down</i> durch Promotormotiv-Änderung (TATA nach GCGC)	Diese Arbeit

<i>PatpB</i> -255:: <i>rpoB</i>	<i>N. tabacum</i> ; <i>PrpoB</i> -345 ersetzt durch <i>PatpB</i> -255	Diese Arbeit
Δ <i>Prrn16</i> -64:: <i>rrn16</i>	<i>N. tabacum</i> ; <i>Prrn16</i> -64 <i>knock out</i> durch Promotormotiv-Änderung (CTTG nach GCGC)	Diese Arbeit
HFS-NtRpoTp	<i>N. tabacum</i> ; konstitutive <i>in vivo</i> Expression HA-FLAG-StrepII-Epitop-markierter RpoTp	Karsten Liere (HU Berlin)
VMF-NtRpoTp	<i>N. tabacum</i> ; konstitutive <i>in vivo</i> Expression VSV-cMyc-FLAG-Epitop-markierter RpoTp	Karsten Liere (HU Berlin)
E2-NtRpoTp	<i>N. tabacum</i> ; konstitutive <i>in vivo</i> Expression E2-Epitop-markierter RpoTp	Karsten Liere (HU Berlin)

2.1.3 Bakterienstämme

Für die Amplifikation rekombinanter Plasmide diente *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) als Wirtstamm. Als Expressionstamm für die heterologe Expression von Proteinen (s. 2.2.10.7) wurde *E. coli* BL21 RIL (Agilent) verwendet.

Die Transformation von *A. thaliana* wurde durch *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 (Lazo *et al.*, 1991) vermittelt.

2.1.4 Plasmide

Eine Beschreibung aller in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide ist der Tabelle 2 zu entnehmen.

Tab. 2: Verwendete Plasmide; Z00044 = *N. tabacum* Plastom, NC_000932 = *A. thaliana* Plastom

Plasmid	Beschreibung bzw. Verwendung	Referenz
pBluescript II KS	Ausgangsvektor für Klonierung der Plasmide zur Plastidentransformation von Tabak; Größe: 2961 bp	Stratagene
pPRV111A	Amplifikation der <i>aadA</i> -Kassette mit <i>PpsbA</i> und <i>TpsbA</i> (GenBank-Zugang: U12812.1)	Zoubenko <i>et al.</i> , 1994
pRB94	Amplifikation der <i>aadA</i> -Kassette mit <i>Prrn16</i> und <i>TpsbA</i> (GenBank-Zugang: AJ312392)	Ruf <i>et al.</i> , 2001
pJS21b	<i>aadA</i> aus pPRV111A <i>Eco</i> 52I/ <i>Sma</i> I in pBluescript II KS	Diese Arbeit
pJS22b	<i>aadA</i> aus pPRV111A <i>Eco</i> 52I/ <i>Pst</i> I in pBluescript II KS	Diese Arbeit
pJS32b	GenBank-Zugang Z00044 Basenposition 58165–50504 <i>Sac</i> I/ <i>Eco</i> 52I und 57177–57019 (<i>PatpB</i> -255) <i>Sma</i> I/ <i>Hind</i> III und 59692–60530 <i>Hind</i> III/ <i>Apa</i> I in pJS21b; Transformationsvektor zur Erzeugung von <i>PatpB</i> -255:: <i>accD</i>	Diese Arbeit
pJS33b	GenBank-Zugang Z00044 Basenposition 58165–50504 <i>Sac</i> I/ <i>Eco</i> 52I und 59513–59674 (<i>PaccD</i> -129 Δ GCGC) <i>Sma</i> I/ <i>Hind</i> III und 59674–60530 <i>Hind</i> III/ <i>Apa</i> I in pJS21b; Erzeugung von Δ <i>PaccD</i> -129:: <i>accD</i>	Diese Arbeit
pJS36b	GenBank-Zugang Z00044 Basenposition 29064–28005 <i>Sac</i> I/ <i>Eco</i> 52I und 57172–57026 (<i>PatpB</i> -255) <i>Pst</i> I/ <i>Apa</i> I und 27646–27208 (<i>rpoB</i>) <i>Apa</i> I/ <i>Kpn</i> I in pJS22b; Erzeugung von <i>PatpB</i> -255:: <i>rpoB</i>	Diese Arbeit

pJS40	GenBank-Zugang Z00044 Basenposition 58165–50504 <i>SacI/Eco52I</i> und 59513–60530 (<i>accD</i>) <i>SmaI/ApaI</i> in pJS21b	Diese Arbeit
pJS44	GenBank-Zugang Z00044 Basenposition 29064–28005 <i>SacI/Eco52I</i> und 27776–27208 (<i>rpoB</i>) <i>PstI/ApaI</i> in pJS22b	Diese Arbeit
pJS51	GenBank-Zugang Z00044 Basenposition 101664–102534 <i>SacI/Eco52I</i> und 102544–102698 (<i>Prrn16</i> -64ΔGCGC) <i>SmaI/ApaI</i> und 102698–103238 (<i>rrn16</i>) <i>ApaI/KpnI</i> in pJS21b; Erzeugung von Δ <i>Prrn16</i> -64:: <i>rrn16</i>	Diese Arbeit
pJS52	GenBank-Zugang Z00044 Basenposition 101664–102534 <i>SacI/Eco52I</i> und 102544–103238 (<i>Prrn16</i>) <i>SmaI/KpnI</i> in pJS21b	Diese Arbeit
pJS60	GenBank-Zugang Z00044 Basenpositionen 75251–74734 <i>SacI/Eco52I</i> und 74737–74585 plus 1737–1598 (<i>PpsbA</i> -85) plus 74510–73719 (<i>clpP1</i>) <i>PstI/KpnI</i> in pJS22b	Diese Arbeit
pJS61	GenBank-Zugang Z00044 Basenposition 75251–74734 <i>SacI/Eco52I</i> und 74737–73719 (Δ <i>PclpP1</i> -53) <i>PstI/KpnI</i> in pJS22b	Diese Arbeit
pJS62	GenBank-Zugang Z00044 Basenposition 75251–74734 <i>SacI/Eco52I</i> und 74737–73719 (<i>clpP1</i>) <i>PstI/KpnI</i> in pJS22b	Diese Arbeit
pJS64	GenBank-Zugang Z00044 Basenposition 32995–32579 <i>SacI/Eco52I</i> und 32573–32479 plus 27966–27855 (<i>PrpoB</i> - 345) plus 32356–31860 (<i>trnE</i>) <i>PstI/KpnI</i> in pJS22b	Diese Arbeit
pJS66	GenBank-Zugang Z00044 Basenposition 32995–32579 <i>SacI/Eco52I</i> und 32573–32398 plus 32368–31860 (Δ <i>PtrnE</i>) <i>PstI/KpnI</i> in pJS22b	Diese Arbeit
pJS67	GenBank-Zugang Z00044 Basenposition 32995–32579 <i>SacI/Eco52I</i> und 32573–31860 (<i>trnE</i>) <i>PstI/KpnI</i> in pJS22b	Diese Arbeit
pBI121	Ausgangsvektor für Klonierung der Plasmide zur Transformation von <i>A. thaliana</i> ; Größe: 14758 bp	Jefferson <i>et al.</i> , 1987; Chen <i>et al.</i> , 2003
pKL218	GUS in pBI121 ersetzt durch Polylinker-Sequenz	Karsten Liere, HU Berlin
pKL215	342 bp PCR-Fragment (AS 1 - 114) der <i>A. t.</i> RpoTp (GenBank-Zugang: AT2G24120.1) <i>XbaI/SpeI</i> und 2.6 kb PCR-Fragment (AS 115 – 994) von RpoTp <i>Cfr9I/ApaI</i> in pBluescript II KS	Karsten Liere, HU Berlin
pKL216	372 bp PCR-Fragment (AS 1 - 117) der <i>A. t.</i> RpoTmp (GenBank-Zugang: AT5G15700.1) <i>XbaI/SpeI</i> und 2.7 kb PCR-Fragment (AS 118 – 1011) von RpoTmp <i>Cfr9I/ApaI</i> in pBluescript II KS	Karsten Liere, HU Berlin
pKL217	288 bp PCR-Fragment (AS 1 - 88) der <i>A. t.</i> RpoTm (GenBank-Zugang: AT1G68990.2) <i>XbaI/SpeI</i> und 2.6 kb PCR-Fragment (AS 89 – 976) von RpoTm <i>Cfr9I/ApaI</i> in pBluescript II KS	Karsten Liere, HU Berlin
pJS1	FLAG-HA-Epitopsequenz <i>SpeI/Cfr9I</i> in pKL215	Diese Arbeit
pJS2	3xFLAG-Epitopsequenz <i>SpeI/Cfr9I</i> in pKL215	Diese Arbeit
pJS3	3xHA-Epitopsequenz <i>SpeI/Cfr9I</i> in pKL215	Diese Arbeit
pJS4	FLAG-HA-Epitopsequenz <i>SpeI/Cfr9I</i> in pKL216	Diese Arbeit
pJS5	3xFLAG-Epitopsequenz <i>SpeI/Cfr9I</i> in pKL216	Diese Arbeit

pJS6	3xHA-Epitopsequenz <i>SpeI/Cfr9I</i> in pKL216	Diese Arbeit
pJS7	FLAG-HA-Epitopsequenz <i>SpeI/Cfr9I</i> in pKL217	Diese Arbeit
pJS8	3xFLAG-Epitopsequenz <i>SpeI/Cfr9I</i> in pKL217	Diese Arbeit
pJS9	3xHA-Epitopsequenz <i>SpeI/Cfr9I</i> in pKL217	Diese Arbeit
pJS10	RpoTp-Epitop-Fragment aus pJS1 <i>XbaI/BshT1</i> in pKL218	Diese Arbeit
pJS11	RpoTp-Epitop-Fragment aus pJS2 <i>XbaI/BshT1</i> in pKL218	Diese Arbeit
pJS12	RpoTp-Epitop-Fragment aus pJS3 <i>XbaI/BshT1</i> in pKL218	Diese Arbeit
pJS13	RpoTmp-Epitop-Fragment aus pJS4 <i>XbaI/BshT1</i> in pKL218	Diese Arbeit
pJS14	RpoTmp-Epitop-Fragment aus pJS5 <i>XbaI/BshT1</i> in pKL218	Diese Arbeit
pJS15	RpoTmp-Epitop-Fragment aus pJS6 <i>XbaI/BshT1</i> in pKL218	Diese Arbeit
pJS16	RpoTm-Epitop-Fragment aus pJS7 <i>XbaI/BshT1</i> in pKL218	Diese Arbeit
pJS17	RpoTm-Epitop-Fragment aus pJS8 <i>XbaI/BshT1</i> in pKL218	Diese Arbeit
pJS18	RpoTm-Epitop-Fragment aus pJS9 <i>XbaI/BshT1</i> in pKL218	Diese Arbeit
pGEM®-T	Klonierung von PCR-Produkten; Größe: 3000 bp	Promega
pMS1b	GenBank-Zugang NC_000932 Basenpositionen 1383-1567 (<i>PpsbA</i>) in pGEM®-T	Diese Arbeit
pMS2b	GenBank-Zugang NC_000932 Basenpositionen 54079-55090 (<i>PatpB</i>) in pGEM®-T	Diese Arbeit
pMS3b	GenBank-Zugang NC_000932 Basenpositionen 71774-72897 (<i>PclpP</i>) in pGEM®-T	Diese Arbeit
pMS4b	GenBank-Zugang NC_000932 Basenpositionen 26281-27626 (<i>PrpoB</i>) in pGEM®-T	Diese Arbeit
pMS5b	GenBank-Zugang NC_000932 Basenpositionen 56207-57314 (<i>PaccD</i>) in pGEM®-T	Diese Arbeit
pMS6b	GenBank-Zugang NC_000932 Basenpositionen 100405-101087 (<i>Prrn16</i>) in pGEM®-T	Diese Arbeit
pGEX-2TK	Ausgangsvektor für heterologe Expression von GST und GST-Fusionsproteinen; Größe: 4900 bp	GE Healthcare
pBB14	<i>Anabaena sp.</i> PCC 7120 <i>nblA</i> <i>NdeI/NdeI</i> in pGEX-2TK/ <i>NdeI</i>	Karradt <i>et al.</i> , 2008
pJS-HisEx	6xHis-Sequenz <i>NdeI/SmaI</i> in pBB14; Ausgangsvektor für heterologe Expression von 6xHis-Fusionsproteinen	Diese Arbeit
pJS19	Kodierende Sequenz der <i>A. t.</i> RpoTp (AS 113-993; GenBank-Zugang: AT2G24120.1) in pGEX-2TK	Diese Arbeit
pJS20	Kodierende Sequenz der <i>N. s.</i> RpoTp (AS 88-978; GenBank-Zugang: AJ416576) in pGEX-2TK	Diese Arbeit
pJS53	Kodierende Sequenz der <i>A. t.</i> RpoTmp (AS 115-1011; GenBank-Zugang: AT5G15700.1) in pGEX-2TK	Diese Arbeit
pJS54	Kodierende Sequenz der <i>N. s.</i> RpoTmp (AS 64-1020; GenBank-Zugang: AB058958) in pGEX-2TK	Diese Arbeit
pJS55	Kodierende Sequenz der <i>A. t.</i> RpoTp (AS 113-993; GenBank-Zugang: AT2G24120.1) in pJS-HisEx	Diese Arbeit
pJS56	Kodierende Sequenz der <i>A. t.</i> RpoTmp (AS 115-1011; GenBank-Zugang: AT5G15700.1) in pJS-HisEx	Diese Arbeit
pJS57	Kodierende Sequenz der <i>N. s.</i> RpoTp (AS 88-978; GenBank-Zugang: AJ416576) in pJS-HisEx	Diese Arbeit
pJS58	Kodierende Sequenz der <i>N. s.</i> RpoTmp (AS 64-1020; GenBank-Zugang: AB058958) in pJS-HisEx	Diese Arbeit

pCold I	Ausgangsvektor für heterologe Expression von 6xHis-Fusionsproteinen	TaKaRa
pCold-His-RpoTp	Kodierende Sequenz der <i>A. t.</i> RpoTp (AS 96-993; GenBank-Zugang: AT2G24120.1) in pCold I	Bohne, 2009
pCold-His-RpoTmp	Kodierende Sequenz der <i>A. t.</i> RpoTmp (AS 107-1011; GenBank-Zugang: AT5G15700.1) in pCold I	Bohne, 2009
pJS67	GenBank-Zugang NC_000932 Basenpositionen 125912-123884 (<i>ycfI</i> aus <i>A. t.</i>) in pJS-HisEx	Diese Arbeit
pJS68	GenBank-Zugang NC_000932 Basenpositionen 125912-123884 (<i>ycfI</i> aus <i>A. t.</i>) in pGEX-2TK	Diese Arbeit

2.1.5 Synthetische Oligonukleotide (*primer*)

Alle Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma und Eurofins MWG Operon synthetisiert und sind im Anhang (s. Tab. A1) bzw. mit den korrespondierenden Methoden aufgeführt.

2.1.6 Antikörper

Tab. 3: Verwendete Antikörper. M = Maus, K = Kaninchen, R = Ratte, Z = Ziege, S = Schaf, *A. t.* = *Arabidopsis thaliana*, *S. j.* = *Schistosoma japonicum*, *O. s.* = *Oryza sativa*, *P. s.* = *Pisum sativum*, p = polyklonal, m = monoklonal, Hämaggl. = Hämagglutinin, HRP = *horseradish peroxidase*, Cp = Chloroplast

Name	Epitop/Antigen (Organismus); aus Organismus; Verdünnung	Hersteller/Referenz
Anti-GST	Glutathion-S-Transferase (<i>S. j.</i>); M, m; 1:5000	Sigma (G1160)
Anti-FLAG® M2	FLAG Peptid (DYKDDDDK); M, m; 1:5000	Sigma (F3165)
Anti-HA	Hämaggl. AS 98-106 (Influenza); M, m; 1:2000	Sigma (H3663)
Anti-HA High Affinity	Hämaggl. AS 98-106 (Influenza); R, m; 1:2000	Roche Applied Science
Anti-His	polyHistidin; M, m; 1:2000	Sigma (H1029)
Anti-RpoB	β-UE von PEP (<i>A. t.</i>); K, p; 1:2000	Uniplastomic (AB018b)
Anti-RpoA	α-UE von PEP (<i>O. s.</i>); K, p; 1:2000	Kusumi <i>et al.</i> , 2004
Anti-AccD	β-UE der Carboxyltransferase (<i>P. s.</i>); K, p; 1:2000	Thelen und Ohlrogge, 2002
Anti-AtpB	β-UE von F1-ATP Synthasen; K, p; 1:2000	Agrisera (AS05085)
Anti-RbcL	RubisCO große UE konserviertes Peptid; K, p; 1:10000	Agrisera (AS03037)
Anti-PsbA	D1 C-terminales, konserviertes Peptid; K, p; 1:10000	Agrisera (AS05084)
Anti-Tic40	Translokion Komplex der inneren Cp Hüllmembran; K, p; 1:2000	Agrisera (AS6149)
Anti-E2	E2 Peptid (SSTSSDFRDR); M, m; 1:2000	MoBiTec (A1100100)

Anti-c-Myc	c-Myc Peptid (EQKLISEEDL); K, p; 1:2000	Sigma (C3956)
Anti-Ratte IgG HRP Konjugat	IgG (R); K, p; 1:200000	Sigma (A9542)
Anti-Kaninchen-IgG HRP-Konj.	IgG (K); Z, p; 1:250000	Sigma (A0541)
Anti-Maus-IgG HRP Konjugat	IgG (M); S, p; 1:250000	GE Healthcare (NXA931)

2.1.7 Software

Die in dieser Arbeit verwendeten Computerprogramme sind im Anhang in Tabelle A2 aufgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht und Transformation von *E. coli*

E. coli Zellen wurden in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten unter Standardbedingungen angezogen (Sambrook und Russell, 2001).

Die Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* TOP10 Zellen erfolgte mittels Hitzeschock (Hanahan, 1983). Zur Selektion plasmidhaltiger Bakterien wurde dem Medium Ampicillin bzw. Carbenicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugefügt. Elektrokompente *E. coli* BL21 Zellen wurden durch Elektroporation (Dower *et al.*, 1988) mit einem GenePulser™ (Biorad) transformiert (Kapazität 125 µFD, Widerstand 200 Ohm) und auf Medium mit Ampicillin und Chloramphenicol in einer Endkonzentration von 68 µg/ml selektiert.

E. coli TOP10 Zellen, die mit pGEM®-T-Derivaten transformiert wurden, wurden zur Blau-Weiß-Selektion positiver Klone auf LB-Medium mit 40 µg/ml X-Gal angezogen.

LB (<i>Lysogeny-Broth</i>)-Medium	1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, pH 7,0 mit NaOH; modifiziert nach Bertani (1951)
LB-Agar	LB-Medium mit 2 % Agar

2.2.2 Anzucht und Transformation von *A. tumefaciens*

Agrobakterien wurden in YEB-Medium oder auf YEB-Platten bei 28 °C für zwei (Flüssigkultur) bzw. drei Tage (Platten) kultiviert. Die Transformation mit Plasmiden erfolgte mittels Elektroporation wie für *E. coli* unter 2.2.1 beschrieben. Zur Selektion der Transformanten wurde dem Medium Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt.

YEB-Medium	0,5 % (w/v) Rinderextrakt, 0,1 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) Pepton, 0,5 % (w/v) Saccharose, 2 mM MgSO ₄ , pH 7,2 mit NaOH
------------	--

2.2.3 Pflanzenanzucht

A. thaliana wurde entweder auf MS- bzw. SEA-Medium oder auf einem Gemisch aus Erde (Einheitserde Typ T, frux[®]) und Vermiculite (4:1, 3-6 mm; DVD) unter Langtagbedingungen (16 h Weißlicht/ 8 h Dunkelheit) bei 23 °C und einer Lichtintensität von ca. $130 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ angezogen.

Tabak wurde auf Erde (s. o.) oder auf MS-Medium kultiviert (Langtagbedingungen, 25 °C, Lichtintensität $200\text{-}350 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$). Die Erde wurde gegebenenfalls gedüngt mit Osmocote Pro 5-6M (ca. 4 g Dünger/ 1 l Erde; Scotts). Die Regeneration von Pflanzenmaterial nach der Plastidentransformation erfolgte auf RMOP-Medium.

Für die Isolation von Chloroplasten aus 7 bis 14 Tage alten Pflanzen wurden sowohl Tabak als auch *A. thaliana* auf einem Polyamidnetz (Maschenweite 500 μm ; Franz Eckert GmbH) ausgebracht, welches auf Erde gelegt wurde.

Zur sterilen Kultivierung wurden die Pflanzensamen zwecks Oberflächensterilisation für 7 min in Sterilisationslösung (0,8 % (w/v) N-Lauroylsarcosin, 30 Vol.-% DanKlorix (Colgate-Palmoliv)) inkubiert und anschließend fünfmal in Reinstwasser gewaschen.

MS-Medium	0,44 % (w/v) Murashige & Skoog Medium (Duchefa), 0,05 % (w/v) MES, 0,5 % (w/v) Pflanzenagar (Duchefa), 3 % (w/v) Saccharose (<i>N. tabacum</i>) bzw. 1 % (w/v) Saccharose (<i>A. thaliana</i>); pH 5,6-5,8 mit KOH; modifiziert nach Murashige und Skoog (1962)
SEA-Medium	0,44 % (w/v) Murashige & Skoog Medium (Duchefa), 0,05 % (w/v) MES, 0,8 % (w/v) Pflanzenagar (Duchefa); pH 5,6-5,8 mit KOH
RMOP-Medium	MS-Medium (<i>N. tabacum</i>) mit Spectinomycin-Dihydrochlorid-Pentahydrat (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Duchefa), 6-Benzylaminopurin (1 mg/ml ; Sigma) und 1-Naphthylethylsäure (0,1 mg/ml ; Sigma); modifiziert nach Svab et al. (1990a)

2.2.4 Agrobakterien-vermittelte Transformation von *A. thaliana*

Die zur Transformation verwendeten Plasmide pJS10 bis pJS18 sind in Tab. 2 näher beschrieben. Die stabile Transformation von *A. thaliana* erfolgte nach der *floral dip* Methode, modifiziert nach Zhang *et al.* (2006). 50 ml YEB-Medium wurden 1:100 mit einer Übernachtskultur eines plasmidhaltigen Agrobakterienklons angeimpft und zwei Tage bei 28 °C und 180 rpm bis zu einer OD von 1,5 kultiviert. Nach Ernte der Zellen bei 5000g wurde das Pellet in 5-10 ml Infiltrationsmedium resuspendiert und die Suspension auf eine OD von 0,8-1,0 eingestellt.

A. thaliana Col-0 (drei Pflanzen pro Topf) wurden angezogen bis pro Topf ca. 20 Infloreszenzen und wenige Schoten entwickelt waren. Die Schoten wurden abgeschnitten und die Blüten ca. 10 Sekunden in die Agrobaktériensuspension getaucht. Anschließend wurden die Pflanzen mit Klarsichtfolie umwickelt und 24 h auf die Seite gelegt, um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu erhalten. Danach wurde die Folie entfernt und die Pflanzen weiter unter Standardbedingungen (2.2.3) angezogen.

Nach der Samenernte wurden primäre Transformanten selektiert durch Aussaat auf MS-Medium mit Kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) entsprechend der plasmidkodierten Resistenz, und Carbenicillin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zur Vermeidung von agrobakterieller Kontamination. Transformanten entwickelten gesunde, grüne Kotyledonen und Blätter und wurden zur Samenproduktion und weiteren Analyse vereinzelt.

Infiltrationsmedium	0,22 % (w/v) Murashige & Skoog Medium (Duchefa), 5 % (w/v) Saccharose, 0,02 % Silwet L-77
---------------------	---

2.2.5 Plastidentransformation in *N. tabacum*

Die stabile Transformation von Tabak-Plastiden erfolgte modifiziert nach Svab und Maliga (1993). Die verwendeten Transformationsvektoren, die alle im Zuge dieser Arbeit kloniert wurden, sind in Tab 2 aufgeführt und im Ergebnisteil (3.1.1) näher beschrieben. Die Resistenzkassette (*aadA*-Kassette) wurde aus dem Vektor pPRV111A bzw. pRB94 (s. Tab. 2) amplifiziert. Tabakpflanzen wurden vier bis sechs Wochen steril in Magenta-Boxen angezogen (s. 2.2.3), die Blätter wurden mit der Blattunterseite nach oben auf MS-Platten gelegt und üN in der Anzuchtkammer gelassen. Mithilfe des Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery Systems (Bio-Rad) wurden die Blätter (10 pro Konstrukt) mit Goldpartikeln (0,6 µM, Bio-Rad), die gemäß Hersteller mit dem Transformationsvektor beladen wurden, beschossen (1100 psi). Zur Regeneration Spectinomycin-resistenter Kalli wurden die Blätter in Stücke geschnitten (0,5 mm x 0,5 mm) und auf RMOP-Platten inkubiert (2 oder mehr Runden), auf MS-Medium bewurzelt und zur Gewinnung von Samen auf Erde umgesetzt. Mittels PCR, Sequenzierung, *Southern Blot* und Keimungstests wurde die Integration der *aadA*-Kassette und der genspezifischen Veränderungen sowie der Segregationsstatus der Pflanzen getestet (s. 3.1.2).

2.2.6 Chloroplastenisolation aus *N. tabacum*

Die Isolation von intakten Chloroplasten aus Tabak erfolgte mit Modifikationen nach Voelker und Barkan (1995). Alle Zentrifugations- und Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C bzw. auf Eis. 30 g Pflanzengewebe wurden in 250 ml eiskaltem GR-Puffer homogenisiert, durch zwei Lagen Miracloth (Calbiochem) gefiltert und bei 4000g zentrifugiert. Das Chloroplastenpellet wurde in 1 ml GR-Puffer resuspendiert, auf einen 40%/80%-Percoll-Stufengradienten geschichtet und bei 6500g für 35 min zentrifugiert. Die intakten Chloroplasten wurden zweimal bei 2600g in GR-Puffer gewaschen und anschließend der Präparation von Stroma und Membranfraktion zugeführt. Die Lyse erfolgte in Lysepuffer und zur Trennung von Stroma und Thylakoidmembranen wurde 30 min bei 16000g zentrifugiert. Die Lagerung des Stromas erfolgte nach Zugabe von 10 Vol.-% Glycerol bei -80 °C. Die Membranfraktion wurde zweimal in Lysepuffer gewaschen und in Thylakoidpuffer bei -80 °C gelagert.

GR-Puffer	350 mM Sorbitol, 50 mM HEPES/KOH (pH 7,6), 2 mM EDTA (pH 8,0), 1 mM MgCl ₂ , 1 mM MnCl ₂ , 5 mM Na-L-Ascorbat, 1 % (w/v) BSA
40%-Gradientenlösung	40 Vol.-% PCBF, 0,006 % (w/v) red. Glutathion, in GR-Puffer
80%-Gradientenlösung	80 Vol.-% PCBF, 0,006 % (w/v) red. Glutathion, in GR-Puffer
PCBF	1 % (w/v) BSA, 1 % (w/v) Ficoll, 3 % (w/v) PEG 6000, gelöst in Percoll (REF)
Lysepuffer	30 mM HEPES/KOH (pH 8,0), 10 mM Mg-Acetat, 200 mM K-Acetat, 2 mM DTT, 0,4 mM PMSF, 0,04 Vol.-% Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science)
Complete Protease Inhibitor Cocktail Stammlösung	1 Tablette in 2 ml <i>A. bidest</i>
Thylakoidpuffer	100 mM Sorbitol, 10 mM HEPES/KOH (pH 8,0), 5 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂

2.2.7 Chloroplastenisolation aus *A. thaliana*

Die Chloroplastenisolation aus *A. thaliana* erfolgte modifiziert nach Kunst *et al.* (1998). Die Chloroplasten wurden bei 1500g pelletiert und es wurde ein 40%/80%-Percoll-Stufengradient bei 6500g verwendet.

Die Lyse der Plastiden sowie die Präparation von Stroma und Thylakoidmembranen erfolgte wie in 2.2.6 beschrieben.

Membransolubilisierung mit β -DM

Entweder wurde das vom Stroma getrennte Membranpellet in Thylakoidpuffer resuspendiert oder das Pellet intakter Chloroplasten wurde in Lysepuffer aufgenommen. Den Suspensionen wurde n-Dodecyl- β -D-Maltosid in einer Endkonzentration von 2 % zugesetzt und 15 min auf Eis inkubiert.

Formaldehyd-crosslinking von 3xFLAG-RpoTp

Das nach Chloroplasten-Isolation gewonnene Pellet von 14 d alten 3xFLAG-RpoTp-Pflanzen und vom Wildtyp wurde jeweils in 1 ml Puffer RB resuspendiert. 100 μ l dieser Suspension wurden mit 2,8 μ l 37 % Formaldehyd für 10 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 15 μ l 1 M Glycin für 5 min bei RT gestoppt. Zum Vergleich wurden jeweils 100 μ l Chloroplastensuspension ohne Behandlung mit Formaldehyd mitgeführt. Nach Pelletieren der Plastiden bei 2600g für 10 min wurden 10 μ l Lysepuffer (s. 2.2.6) und 5 μ l 1x Ladepuffer (s. 2.2.10.3) zugeben und die Proben mittels SDS-PAGE analysiert.

Puffer RB	6 mM Sorbitol, 0,1 M Tricin/KOH (pH 8,4), 0,0125 M EDTA (pH 8,0), 0,025 M $MgCl_2$
-----------	--

2.2.8 Mitochondrienisolation aus *A. thaliana*

Mitochondrien wurde nach der Methode von Werhahn *et al.* (2001) isoliert. Eine Lyse der Mitochondrien erfolgte mit Lysepuffer wie für Chloroplasten in 2.2.6 beschrieben.

2.2.9 Nukleinsäuren

2.2.9.1 Extraktion von Gesamt-DNA

Zur Extraktion von DNA modifiziert nach Murray und Thompson (1980) wurde das Pflanzengewebe in flüssigem Stickstoff homogenisiert und nach Zugabe von DNA-Extraktionspuffer (300 mg/ 1 ml) für 30 min bei 60 °C inkubiert. Nach Extraktion mit 1 Vol. Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) wurde die DNA mit 0,6 Vol. Isopropanol 1 h bei RT gefällt (Sambrook und Russell, 2001) und anschließend bei 16000g und 4 °C für 30 min pelletiert. Schließlich wurde die DNA in 70 % Ethanol gewaschen und in *A. bidest* aufgenommen. Für einen anschließenden *Southern Blot* wurde die DNA mit RNase A behandelt.

DNA-Extraktionspuffer	2,5 % (w/v) CTAB, 100 mM Tris/HCl (pH 8,0), 25 mM EDTA (pH 8,0), 1,5 M NaCl, 0,2 % (w/v) β -Mercaptoethanol
-----------------------	---

DNA für PCR-Screenings wurde durch eine schnelle Extraktionsmethode gewonnen. Hierfür wurde das Pflanzenmaterial mit der Pipettenspitze homogenisiert, mit Schnell-Extraktionspuffer gemischt und 5 min bei 16000g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,6 Vol. Isopropanol gefällt und sofort für 20 min bei 16000g zentrifugiert. Nach einem Waschschrift in 70 % Ethanol wurde das DNA-Pellet in 20 µl *A. bidest* resuspendiert.

Schnell-Extraktionspuffer 200 mM Tris/HCl (pH 8,0), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA (pH 8,0), 0,5 % (w/v) SDS

2.2.9.2 Isolation von Chloroplasten-DNA

Die Extraktion von plastidärer DNA, die weitestgehend frei ist von nukleärer DNA, erfolgte modifiziert nach Bookjans *et al.* (1984). Die Extraktion der DNA erfolgte mit 1 Vol. Roti®-Phenol (Roth) und anschließend mit 1 Vol. Chloroform:Isoamylalkohol (24:1). Nach Präzipitation mit 2,5 Vol. 96 % Ethanol und einmaligem Waschen in 70 % Ethanol wurde die cpDNA in *A. bidest* resuspendiert. Die Reinheit der cpDNA wurde durch Verdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen überprüft.

2.2.9.3 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Sambrook und Russell, 2001). Vor der Sequenzierung wurde die Plasmid-DNA über QIAquick Säulchen (Qiagen, PCR-Purification-Protokoll) gereinigt.

Zur Präparation von Plasmiden im größeren Maßstab wurde das Plasmid-Midi-Kit (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

2.2.9.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer Sequenzen aus genomischer DNA oder Plasmid-DNA wurde *Taq* DNA-Polymerase (Qiagen) genutzt. Ein 50 µl-Reaktionsansatz enthielt den mitgelieferten Puffer, 1 U *Taq* DNA-Polymerase, 200 µM dNTPs, jeweils 10 pmol der entsprechenden Oligonukleotide und 10 ng Plasmid-DNA bzw. 100 ng genomische DNA. Die PCR wurde in einem T3000 Thermocycler (Biometra®) nach folgendem Programm durchgeführt: 94 °C/ 1 min; 35 Zyklen mit 95 °C/ 30 s, 52-62 °C/ 30 s, 72 °C/ 1 min pro kb; 72 °C/ 5 min.

Für Klonierungen wurde Phusion® High Fidelity DNA-Polymerase (NEB) verwendet, da diese eine *proofreading*-Funktion besitzt. Ein 50 µl-Reaktionsansatz enthielt den mitgelieferten Puffer HF, 1 U Phusion® DNA-Polymerase, 200 µM dNTPs, jeweils 25 pmol der entsprechenden *primer* und 50 ng genomische DNA. Die PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt: 98 °C/ 30 s; 35 Zyklen mit 98 °C/ 10 s, 58-65 °C/ 30 s, 72 °C/ 15 s pro kb; 72 °C/ 5 min.

Die Produkte wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.2.9.9) analysiert.

2.2.9.5 Klonierung

Standardprozeduren zur Manipulation von DNA wie Restriktionsverdaus, Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mittels Alkalischer Phosphatase und Ligation von DNA-Molekülen mittels T4-DNA-Ligase wurden wie in Sambrook und Russell (2001) beschrieben durchgeführt.

Zur direkten Klonierung von PCR-Fragmenten in pGEM®-T wurde das pGEM®-T Vector System (Promega) entsprechend den Angaben des Herstellers genutzt.

2.2.9.6 Reinigung von DNA-Fragmenten und Sequenzierung

PCR-Produkte und Fragmente aus Restriktionsverdaus wurden mittels QIAquick Säulchen (Qiagen) entsprechend des PCR-Purification-Protokolls bzw. des Gel-Extraction-Protokolls gereinigt. DNA-Fragmente größer als 5000 bp wurden mithilfe des JETsorb Gel Extraction Kit 300 (Genomed) aus Gelen extrahiert.

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma SMB (Services in Molecular Biology, Rüdersdorf, Deutschland) durchgeführt.

2.2.9.7 Extraktion von RNA

RNA aus Pflanzengewebe wurde mit dem TRIzol® Reagenz (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers gewonnen.

2.2.9.8 Qualität und Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Qualität von Nukleinsäurelösungen wurde mit dem NanoDrop® 1000 (peqLab) photometrisch bestimmt.

2.2.9.9 Agarosegelelektrophorese von DNA

DNA-Proben wurden mit 0,2 Vol. 5x DNA-Ladepuffer versetzt und in 0,8-2 % (w/v) Agarosegelen parallel zu einem Größenstandard (GeneRuler™ 1 kb Ladder, 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas) in 1x TAE als Laufpuffer aufgetrennt (Sambrook und Russell, 2001). Es wurden horizontale Elektrophoresekammern (PerfectBlue-Gelsystem Mini bzw. Midi, peqLab; Hoefer Scientific Instruments Model HE99X) bei einer Spannung von 5-10 V/ cm verwendet. Die Visualisierung der DNA-Banden unter UV-Licht erfolgte am Gel Doc™ XR (Bio-Rad).

5x DNA-Ladepuffer	30 % Glycerin, 10 mM EDTA (pH 8,0), 0,1 % Bromphenolblau, 0,1 % Xylencyanol
1x TAE	40 mM Tris-Acetat (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)

2.2.9.10 Agarosegelelektrophorese von RNA

RNA-Proben wurden mit 0,3 Vol. RNA-Ladepuffer gemischt, 10 min bei 85 °C denaturiert und auf 1 % (w/v) Agarosegelen neben 2 µl eines Größenstandards (RiboRuler™ RNA Ladder High Range bzw. Low Range, Fermentas) in 1x MEN aufgetrennt. Es wurden horizontale Elektrophoresesysteme (PerfectBlue-Gelsystem Mini bzw. Midi, peqLab) benutzt. Die angelegte Spannung betrug 5-10 V/ cm. Die RNA-Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht mit dem Gel Doc™ XR (Bio-Rad).

RNA-Ladepuffer	50 Vol.-% Formamid, 20 Vol.-% Formaldehyd, 10 Vol.-% 10x MEN, 20 Vol.-% Glycerol, 10 mM EDTA (pH 8,0), 0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 0,2 % (w/v) Xylencyanol, 0,005 % (w/v) Ethidiumbromid
----------------	--

10x MEN	200 mM MOPS, 10 mM EDTA (pH 8,0), 80 mM NaAc, pH 8,0 mit NaOH
1x MEN	10 Vol.-% 10x MEN, 1 % (w/v) Formaldehyd
RNA-Agarosegel	1 g Certified™ Molecular Biology Agarose (Bio-Rad) in 85 ml H ₂ O und 10 ml 10x MEN aufkochen, nach Abkühlen auf 60 °C 5 ml Formaldehyd zusetzen

2.2.9.11 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von DNA

Die PAGE diente der Auftrennung von Produkten der *primer extension* Analyse und der Sequenzierung nach der *Fast Sequencing*-Methode. Sie erfolgte in 0,4 mm dicken Polyacrylamidgelen in 0,6x TBE als Laufpuffer im Model S2 Sequencing Gel Electrophoresis Apparatus (Biometra). Die mit Formamidpuffer gemischten Proben wurden 10 min bei 85 °C denaturiert und nach einem 10-minütigen Vorlauf der Gele bei 50 W Konstantleistung für 1,5 h aufgetrennt. Nach Überführung der Gele auf 3 MM Filterpapier (Whatman) wurden diese im Gel Dryer Model 583 (Bio-Rad) 30 min getrocknet und für drei Tage auf K-Type Imaging Screens exponiert. Die auf die Imaging Screens übertragenen Signale wurden mittels Phosphorimager (Molecular Imager FX, Bio-Rad) visualisiert und mithilfe der Software QuantityOne® Version 4.6.2 (Bio-Rad) ausgewertet.

Sequenzgel	4 % Acrylamid, 7 M Harnstoff, 1x TBE, 0,05 % (w/v) APS, 0,0005 Vol.-% TEMED
Acrylamid/Bis-Acrylamid-Stammlösung	Gel 40 (19:1, Roth)
1x TBE	90 mM Tris-Base, 90 mM Borsäure, 1 mM EDTA (pH 8,0)

2.2.9.12 DNA-Transfer (*Southern Blot*)

Durch Restriktionsendonukleasen verdaute und gelelektrophoretisch aufgetrennte (s. 2.2.9.9) DNA wurde modifiziert nach Southern (1975) auf eine Nylonmembran (Hybond™-N+, Amersham Biosciences) transferiert. Der Transfer erfolgte nach dem Prinzip des Kapillarblots in den Denaturierungspuffer. Anschließend wurde die Membran zweimal 20 min in 2x SSC gewaschen und zur Immobilisierung der DNA mit UV-Licht bestrahlt (150 mJ, GS-Genelinker-UV-Kammer, Bio-Rad). Danach erfolgte die Hybridisierung mit DNA-Sonden.

Denaturierungspuffer	0,4 M NaOH, 0,6 M NaCl
2x SSC	10 Vol.-% 20x SSC
20x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0 mit HCl

2.2.9.13 RNA-Transfer (*Northern Blot*)

Elektrophoretisch aufgetrennte RNA (s. 2.2.9.10) wurde nach dem Prinzip des Kapillarblots in 10x SSC in auf eine Nylonmembran (Hybond™-N+, Amersham Biosciences) übertragen. Danach wurde die Membran kurz in 10x SSC gewaschen und es erfolgte wie in 2.2.9.12 beschrieben eine Immobilisierung der RNA durch UV-Licht. Die Membran wurde entweder trocken gelagert oder der Hybridisierung mit DNA-Sonden zugeführt. Zuvor wurde die Membran zur Qualitäts- und Beladungskontrolle mit Methyleneblaulösung gefärbt (30 s Inkubation, Entfärben mit *A. bidest*).

10x SSC	50 Vol.-% 20x SSC
Methylenblaulösung	0,3 M NaAc (pH 5,2), 0,03 % (w/v) Methylenblau

2.2.9.14 *Dot Blot-Transfer präzipitierter RNA*

Zu 20 µl IP-RNA (s. 2.2.10.5) wurden 300 µl Probenpuffer gegeben und die Proben 10 min bei 75 °C denaturiert. Nach Zugabe von 240 µl 20x SSC wurden 80 µl Probe pro Loch (*Dot*) auf eine Nylonmembran (Hybond™-N, Amersham Biosciences) übertragen. Zuerst wurden die Löcher mit 10xSSC gespült, anschließend erfolgte der Transfer der RNA-Proben mithilfe des Bio-Dot® SF Microfiltration Apparatus unter Vakuum. Nach einem Waschschrift mit 10x SSC wurde das Vakuum für weitere 5 min belassen. Danach wurde die Membran wie in 2.2.9.12 beschrieben mit UV-Licht behandelt und trocken gelagert oder zur Hybridisierung herangezogen.

Probenpuffer	66 Vol.-% deionisiertes Formamid, 21 Vol.-% Formaldehyd, 13 Vol.-% 1x MEN
--------------	---

2.2.9.15 *Radioaktive Markierung von DNA-Sonden*

Die Markierung von DNA-Sonden (PCR-Produkten) unter Einbau von [α -³²P]-dCTP erfolgte mit dem DecaLabel™ DNA Labeling Kit (Fermentas) entsprechend den Vorgaben des Herstellers.

Die Herstellung von DNA-Einzelstrangsonden erfolgte durch PCR mit *Taq* DNA-Polymerase (s. 2.2.9.4), wobei nur ein Oligonukleotid (*rev-primer*) eingesetzt wurde, sowie 100 ng PCR-Produkt als *template* und [α -³²P]-dCTP statt dCTP. Freie Radioaktivität wurde gemäß Herstellerangaben mithilfe von illustra MicroSpin G50-Säulchen (GE Healthcare) entfernt. Zur 5'-Endmarkierung von DNA-Oligonukleotiden mit [γ -³²P]-ATP wurde die T4-Polynukleotidkinase (Fermentas) entsprechend den Angaben des Herstellers (*forward reaction*) verwendet. Freie Radioaktivität wurde gemäß Herstellerangaben mittels illustra MicroSpin G25-Säulchen (GE Healthcare) entfernt.

Tab. 4: Oligonukleotide zur Erzeugung von DNA-Sonden. SB = *Southern Blot*, NB = *Northern Blot*

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Ziel	Verwendung
sb-tp <i>Nt-accD</i> -fw	CCTAGTGATTGGATTTCTATGC	<i>N. t. accD</i>	SB
sb-tp <i>Nt-accD</i> -rev	GAATTATAGTAGGGATCTTCGC		
NB- <i>Nt-accD</i> -fw	AAGAAGGAGTTCGAACGCAGG	<i>N. t. accD</i>	NB
NB- <i>Nt-accD</i> -rev	ACTATTTGCGACTTTCACCACCAC		
<i>Nt-psbA</i> -fw	GAAAGCGAAAGCCTATGGGG	<i>N. t. psbA</i>	NB
<i>Nt-psbA</i> -rev	CTAAGCTCCCACTCACGACCC		
<i>Nt-psbD</i> -fw	GCCCTTGGTAAAGTTTACCAAAGACG	<i>N. t. psbD</i>	NB
<i>Nt-psbD</i> -rev	GGAGAGCAACAAAAGTCCACAGACC		
<i>Nt-psbE</i> -fw	GGAAGCACAGGAGAACGTTTCG	<i>N. t. psbE</i>	NB
<i>Nt-psbE</i> -rev	CCAAAGGATCAAAACGGCC		
sb-tp <i>Nt-rpoB</i> -fw	TAAGTAGCAGAAGTCTGTTTCTAGGG	<i>N. t. rpoB</i>	SB
sb-tp <i>Nt-rpoB</i> -rev	TTCCGTCAAACCTTGATCAATGAACC		
NB- <i>Nt-rpoB</i> -fw	GGGATGGAAATGAGGGAATATC	<i>N. t. rpoB</i>	NB
NB- <i>Nt-rpoB</i> -rev	TTCGGTTCATATTTTCGTCGACC		
NB- <i>NtrpoC1</i> Ex1-fw	CAGCTCCGAATTGGATCAGT	<i>N. t. rpoC1</i>	NB
NB- <i>NtrpoC1</i> Ex1-rev	GTTACTGGGCATGCGAGTTT		
NB- <i>NtrpoC2</i> -fw	CGGGCACAACCAATCTCTAT	<i>N. t. rpoC2</i>	NB
NB- <i>NtrpoC2</i> -rev	CAGTGCATTTCTCCGTCTGA		

sb-tp <i>Nt-rrn16</i> -fw	GCAACTATGAATCTCATGGAG	<i>N. t. rrn16</i>	SB, NB
sb-tp <i>Nt-rrn16</i> -rev	CCGTCATTGCTTCTTCTCC		
NB-Oligo- <i>Ntrrn16</i>	CGTAGACAAAGCGGATTCGGAATTG	<i>N. t. rrn16</i>	NB
NB-Oligo- <i>trnC</i>	GTCCTCTGCCTTACCACTCGG	<i>N. t. trnC</i>	NB
NB- <i>At18S</i> -fw	AAACGGCTACCACATCCAAG	<i>A. t. rrn18</i>	NB
NB- <i>At18S</i> -rev	ACTCGAAAGAGCCCCGTATT		
5' <i>AtaccD</i>	ATGGTTGGGATGAGCGTTCT	<i>A. t. accD</i>	NB
3' <i>AtaccD</i>	AAGTACCCGGATCAATCGAAA		
5' <i>AtatpB</i>	AGGTCCTGTCGATACTCGCA	<i>A. t. atpB</i>	NB
3' <i>AtatpB</i>	ATCTAAAGGATCTACCGCTGGATA		
5' <i>AtclpP</i> complete	CCGACTAGGATAAAGGATGCTATTG	<i>A. t. clpP</i>	NB
3' <i>AtclpP</i> complete	CCAAGAGGTTGATACCGAAATC		
5' <i>Atpsba</i>	ACTTCTGTTTTTATTATCGCATTTCATTG	<i>A. t. psbA</i>	NB
3' <i>Atpsba</i>	TCCATACCAAGGTTAGCACGG		
NB- <i>AtrpoB</i> -fw	CCAAAAATTGAAGATATAGATCACG	<i>A. t. rpoB</i>	NB
NB- <i>AtrpoB</i> -rev	CATATCATCAAGTGTACCCATTCC		
NB- <i>Atycf1</i> -fw	AATTCGGTCGTTGTGGTCGG	<i>A. t. ycf1</i>	NB
NB- <i>Atycf1</i> -rev	TGCTAAATGCAGAGGCGCA		
NB- <i>Atycf2</i> -fw	GATAGGAAGGGCTGTTGCACA	<i>A. t. ycf2</i>	NB
NB- <i>Atycf2</i> -rev	GGGTCGAGGACTCCTTCTCC		

2.2.9.16 Hybridisierung und Detektion von DNA-Sonden

Die Membranen wurden zunächst im Hybridisierungspuffer 1 h prähybridisiert. Für den *Southern Blot* wurden die DNA-Sonden (PCR-Produkte, s. 2.2.9.15) bei 58 °C in Hybridisierungspuffer üN mit der DNA hybridisiert. Die Inkubation von PCR- und Einzelstrangsonden (s. 2.2.9.15) mit RNA erfolgte bei 55 °C, von Oligonukleotidsonden (s. 2.2.9.15) mit RNA bei 45 °C üN. Die Membranen wurden bei der jeweiligen Hybridisierungstemperatur gewaschen, für DNA-Membranen wie folgt: zweimal 20 min in Waschlösung 1, einmal 20 min in Waschlösung 2; für RNA-Membranen: zweimal 10 min in Waschlösung 2, einmal 10 min in Waschlösung 3, optional einmal 10 min in Waschlösung 4. Die Detektion der Sonden erfolgte mit Imaging Screens am Phosphorimager (Molecular Imager FX, Bio-Rad).

Hybridisierungspuffer	0,25 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2 mit H ₃ PO ₄), 7 % (w/v) SDS
Waschlösung 1	2x SSC, 1 % (w/v) SDS
Waschlösung 2	1x SSC, 0,5 % (w/v) SDS
Waschlösung 3	0,5x SSC, 0,1 % (w/v) SDS
Waschlösung 4	0,1x SSC, 0,1 % (w/v) SDS

2.2.9.17 Primer extension Analyse

Zur 5'-Endmarkierung wurden 10 pmol des jeweiligen, genspezifischen Oligonukleotids in PNK-Reaktionspuffer A (Fermentas) mit 10 U T4-Polynukleotidkinase (Fermentas) und 50 µCi [γ -³²P]-ATP in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 40 µl 1x Hybridisierungspuffer wurde freie Radioaktivität mittels illustra MicroSpin G25-Säulchen (GE Healthcare) entfernt.

Je nach erwarteter Signalstärke wurden 8-15 µg RNA in 1x Hybridisierungspuffer an 0,6 pmol des radioaktiv-markierten Oligonukleotids in einem Gesamtvolumen von 15-25 µl hybridisiert. Das Gemisch wurde erst 10 min bei 85 °C erhitzt, und dann für 3 h bei 42 °C

inkubiert. Die RNA-Oligonukleotid-Dimere wurden nach Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Vol. 96 % Ethanol üN bei -20 °C gefällt.

Das nach Zentrifugation gewonnene Pellet wurde in 80 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl Reaktions-Mix aus *First Strand*-Puffer (Invitrogen), 100 nmol DTT, 1 µg Actinomycin D (Roth), je 20 nmol dNTPs, 13 U RiboLock™ RNase-Inhibitor (Fermentas) und 200 U Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) resuspendiert. Die reverse Transkription erfolgte für 2 h bei 55 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) gestoppt. Es folgte ein RNase-Verdau mit RNaseA/T1-Mix (Fermentas) für 30 min bei 37 °C und danach eine Fällung der cDNA mit 0,1 Vol. 3 M NaAc (pH 5,2) und 2,5 Vol. 96 % Ethanol üN bei -20 °C. Das Präzipitat wurde gewaschen, in 5 µl Formamidpuffer aufgenommen und anschließend mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (s. 2.2.9.11) analysiert.

10x Hybridisierungspuffer	0,1 M Tris/HCl (pH 8,3), 1,5 M KCl, 10 mM EDTA
Formamidpuffer	96 % (v/v) Formamid, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau, 0,02 % (w/v) Xylencyanol

Tab. 5: Oligonukleotide für die *primer extension* Analyse.

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Ziel	Position in cpDNA
PEN <i>taccD</i>	GAATATCTTATTTCTATCAGACTAAGC	<i>N. t. accD</i>	59771
peN <i>taccD</i> -Mut	CTAGGATTATTAATAAAGGATTGT	<i>N. t. accD</i>	59733
peN <i>taccD</i> 33b	TTAATATGTTGGAACCCCTTATATTA	<i>N. t. accD</i>	59659
PEN <i>trpB</i> -106	CCGAATCATATGAAATTTACCCAAC	<i>N. t. rpoB</i>	27622
peN <i>trpB</i> -Mut	GCTACTTAGACTTATTAATTAAGTTATAG	<i>N. t. rpoB</i>	27788
PEN <i>rrn16</i>	GATTCATAGTTGCATTACTTATAGCTTCC	<i>N. t. rrn16</i>	102762
EmCE <i>aadA</i> -1477	TATCAGCCCGTCATACTTGAAGCTA	<i>E. c. aadA</i>	-
PEA <i>taccD</i>	CCACGATTTTTCATAGAGCTTCTG	<i>A. t. accD</i>	57089
PE4A <i>atpB</i>	CAAGCGGATGTGGAATTCAATTTT	<i>A. t. atpB</i>	54281
PEA <i>clpP</i>	GGTACTTTTGGAACGCCAATAGGC	<i>A. t. clpP</i>	71857
PEA <i>psbA</i>	TCCAGTTACAGAAGCGACCCCATAG	<i>A. t. psbA</i>	1384
PE4A <i>trpB</i>	TACTGAATCATATGAAATTTTATCCAATCC	<i>A. t. rpoB</i>	26445
PE3A <i>rrn16</i>	CGTAGACAAAGCTGATTTCGGAATTG	<i>A. t. rrn16</i>	100979/137670

2.2.9.18 Radioaktive Sequenzierung von DNA (*Fast Sequencing*)

Es wurden 2 µg Plasmid-DNA mit 100 nmol NaOH in 4 µl Gesamtvolumen bei 37 °C für 5 min denaturiert. Die weiteren Schritte des *Fast Sequencing* wurden mit dem DNA Sequenase™ Version 2.0 DNA Sequencing Kit (USB) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Produkte der Reaktion wurden mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (s. 2.2.9.11) analysiert

2.2.9.19 Quantitative *real-time* PCR

Für die quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR) wurde die extrahierte RNA (s. 2.2.9.7) mithilfe des RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben gereinigt. Nach Bestimmung der RNA-Konzentration (s. 2.2.9.8) wurde zur Qualitäts- und Mengenkontrolle eine Agarosegelelektrophorese (s. 2.2.9.10) durchgeführt. Danach erfolgte die Synthese von cDNA aus 2 µg Gesamt-RNA (RT+) mit dem QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen) entsprechend den Vorgaben des Herstellers. Als Kontrollreaktion wurden 0,5 µg RNA für eine Synthese ohne Reverse Transkriptase (RT-) eingesetzt.

Die PCR-Reaktion erfolgte mit dem 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) und Sonden des Universal Probe Library Set (Roche Applied Science) gemäß Herstellervorgaben. Die genspezifischen Oligonukleotid-Paare ergaben PCR-Produkte von 70-100 bp. Eine 15 µl-Reaktion enthielt 50 ng cDNA (33,3 Vol.-% RT+ bzw. RT-), 0,5 Vol.-% TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), jeweils 1 µM Oligonukleotid und 100 nM Sonde. Folgendes PCR-Programm wurde genutzt: 95 °C/ 10 min; 40 Zyklen mit 95 °C/ 15 s, 60 °C/ 1 min. Als weitere Kontrolle wurde für jedes *primer*-Paar eine Probe ohne *template* (NTC) mitgeführt. Jedes biologische Replikat wurde in zwei technischen Replikaten, und jedes technische Replikat in Triplikaten analysiert. Zur Auswertung der Daten wurde die Sequence Detection Software 1.4 (Applied Biosystems) herangezogen. Zur Normalisierung aller Quantifizierungen wurde die Transkriptmenge von nuklearem Ubiquitin (UBQ) als interner Standard nach der ΔC_T -Methode genutzt:

$$2^{(-\Delta C_T)} = \text{relative Transkriptmenge}; \Delta C_T = C_T^{\text{Zielgen}} - C_T^{\text{interner Standard}}$$

Tab. 6: Oligonukleotid-Paare für die qRT-PCR und Sonden des Universal Probe Library Set

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Position	Probe Library Nr.
qNt-UBQ-5'	GGACCAGCAGAGGTTGATCT	Chromosom IV	38
qNt-UBQ-3'	TCAGCCAAGGTCCTTCCAT	Chromosom IV	
qRT-NtaccD-left	GCAAATAGGGGGCAAGAAA	59825 cpDNA	157
qRT-NtaccD-right	CTGCGTTCGAACCTCTTCTTA	59901 cpDNA	
5'q_NtrpoB	CTCGAACGAGCAATCGAAA	24384 cpDNA	50
3'q_NtrpoB	TCATTGGGGGAACAATACCT	24446 cpDNA	

2.2.9.20 5'-RACE Analyse

Primäre 5'-Enden plastidärer Transkripte von Tabak wurden mittels 5'-RACE nach Bensing *et al.* (1996) mit folgenden Modifikationen kartiert. 5'-Triphosphate wurden in Monophosphate umgewandelt durch Behandlung von 2 µg RNA mit 10 U Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP, Epicentre) in Gegenwart von 40 U RiboLock™ RNase-Inhibitor (Fermentas) im entsprechenden Puffer für 1 h bei 37 °C. Im Kontrollversuch wurde keine TAP hinzugefügt. Die RNA wurde mit Roti®-Phenol (Roth) extrahiert, durch Zugabe von 3 Vol. 96 % EtOH/ 3 M NaAc pH 5,2 (30:1) üN bei -20 °C gefällt, in 70 % EtOH gewaschen und in *A. bidest* aufgenommen.

Die Ligation von 10 pmol 5'-RNA-Oligonukleotid RUMSH (Metabion) an die 5'-Transkriptenden erfolgte mit 50 U T4 RNA Ligase (Epicentre) für 1 h bei 37 °C in Gegenwart von 40 U RiboLock™ RNase-Inhibitor (Fermentas) und 100 nmol ATP im entsprechenden Puffer. Die RNA wurde wie zuvor beschrieben extrahiert, gefällt, gewaschen und in 2 µl *A. bidest* resuspendiert.

Davon wurde 1 µl mit 1 µl genspezifischen RT-Oligonukleotid (P1) bei 75 °C für 10 min denaturiert und durch Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) entsprechend den Herstellerangaben für 1 h bei 55 °C revers transkribiert. Nach Inkubation mit 2,5 U RNase H (Fermentas) für 20 min bei 37 °C wurde die cDNA durch Zugabe von 3 Vol. 96 % EtOH/ 3 M NaAc pH 5,2 (30:1) üN bei -20 °C gefällt, in 70 % EtOH gewaschen und in 20 µl *A. bidest* aufgenommen. Es folgten zwei PCR-Reaktionen mit *Taq* DNA-Polymerase (s. 2.2.9.4). Die erste PCR erfolgte mit 10 Vol.-% der cDNA, dem genspezifischen Rückwärts-*primer* P1 und dem RUMSH-spezifischen Vorwärts-*primer* 1. Die zweite PCR wurde mit 2/50 der ersten PCR als *template*, dem RUMSH-spezifischen Vorwärts-*primer* 2 und einem genspezifischen Rückwärts-*primer*, der weiter stromaufwärts hybridisiert (*nested* PCR), durchgeführt.

Folgendes Programm wurde genutzt: 94 °C/ 1 min; 35 Zyklen mit 95 °C/ 30 s, 54-58 °C/ 30 s, 72 °C/ 1 min; 72 °C/10 min. Die Produkte wurden gelelektrophoretisch analysiert (s. 2.2.9.9), aus dem Gel extrahiert (s. 2.2.9.6), in pGEM®-T kloniert (s. 2.1.4, Tab. 2) und sequenziert.

Tab. 7: Oligonukleotide für die 5'-RACE Analyse

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Ziel	Verwendung
RUMSH	GUGAUCCAACCGACGCGACAAGCU AAUGCAAGANN	-	RNA-Linker
RUMSH-1	TGATCCAACCGACGCGAC	RUMSH	PCR1
RUMSH-2	ACCGACGCGACAAGCTAATGC	RUMSH	PCR2
RACE- <i>NtrpoB</i> -1	TGAACGGAGGAAGAAAGAGAA	<i>N. t. rpoB</i>	RT, PCR1
RACE- <i>NtrpoB</i> -2	GGAATTTTCAACAGATACAAATGG	<i>N. t. rpoB</i>	PCR2
RACE- <i>NtaccD</i> -1	CTGCGTTTCAACTCCTTCTT	<i>N. t. accD</i>	RT, PCR1
RACE- <i>NtaccD</i> -2	TTTCTTGCCCCCTATTTC	<i>N. t. accD</i>	PCR2
RACE- <i>rrn16</i> -rev1	TCCCAAGGGCAGGTTCTTAC	<i>N. t. rrn16</i>	RT, PCR1
RACE- <i>rrn16</i> -rev2	CCACTGGAAACACCACTTCC	<i>N. t. rrn16</i>	PCR2
RACE- <i>rrn16</i> -rev3	AAGCGGATTCGGAATTGTC	<i>N. t. rrn16</i>	PCR1, PCR2

2.2.9.21 Detektion der Edierungsstelle von *rpoB* aus Tabak

Jeweils 3 µg Gesamt-RNA wurden zur Entfernung genomischer DNA mit 2 µl *Wipeout Buffer* des QuantiTect® Reverse Transcription Kits (Qiagen) in einem Gesamtvolumen von 14 µl bei 42 °C für 5 min inkubiert und die Reaktion wurde auf Eis gestoppt. Nach Zugabe von 1 µl *rpoB*-spezifischem Rückwärts-*primer* und Denaturierung bei 75 °C für 10 min erfolgte die reverse Transkription durch Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) entsprechend den Herstellerangaben für 1 h bei 55 °C. Es wurde jeweils ein Ansatz ohne Enzym als Kontrolle mitgeführt. Der Reaktionsansatz wurde mit 1 µl RNase A/T1-Mix (Fermentas) verdaut. Die cDNA wurde mit Roti®-Phenol (Roth) extrahiert und mit 3 Vol. 96 % EtOH/ 3 M NaAc pH 5,2 (30:1) üN bei -20 °C gefällt, in 70 % EtOH gewaschen und in 20 µl *A. bide* aufgenommen. Davon wurden 2 µl für eine PCR mit *rpoB*-spezifischen Rückwärts- und Vorwärts-Oligonukleotiden und *Taq* DNA-Polymerase eingesetzt. Eine zweite PCR wurde mit 1/10 der ersten PCR und denselben Oligonukleotiden durchgeführt. Folgendes Programm wurde genutzt: 94 °C/ 1 min; 35 Zyklen mit 95 °C/ 30 s, 54 °C/ 30 s, 72 °C/ 1 min; 72 °C/10 min. Die Produkte wurden gelelektrophoretisch analysiert (s. 2.2.9.9), aus dem Gel extrahiert (s. 2.2.9.6), in pGEM®-T kloniert (s. 2.1.4, Tab. 2) und sequenziert.

Tab. 8: Oligonukleotide für die Detektion der *rpoB*-Edierungsstelle

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Ziel
Ed- <i>NtrpoB</i> -fw	AATTTTAGCGGATGGTGCTG	<i>N. t. rpoB</i>
Ed- <i>NtrpoB</i> -rev	TGGGCTTCTAAATGCGGTAT	<i>N. t. rpoB</i>

2.2.9.22 Differentielle RNA-Sequenzierung (Illumina Sequenzierung)

Chloroplasten der auf MS_{Spec}-Medium angezogenen Tabakmutanten wurden isoliert (s. 2.2.6) und RNA mit TRIzol (Invitrogen) entsprechend den Angaben des Herstellers präpariert. Die Qualität der RNA wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft, die RNA durch DNase I (NEB) von genomischer DNA befreit, mit Roti®-Phenol (Roth) extrahiert und üN mit 2,5 Vol. 96 % EtOH/ 0,1 M NaAc pH 6,5 präzipitiert. Der DNA-Verdau wurde mittels PCR mit

Oligonukleotiden überprüft, die die Promotorregion von *psbD* amplifizieren (s. Tab. 9). 5 µg RNA jeder Probe wurden zur Entfernung prozessierter Transkripte mit TEX (Epicentre) verdaut bzw. als Kontrolle nur in Puffer inkubiert. Die TEX- und anschließende TAP-Behandlung, die Präparation der cDNA-Bibliothek und die Illumina Sequenzierung erfolgten wie in Zhelyazkova *et al.* (2012b) beschrieben. Die Sequenzierung wurde am Max Planck Institut für Molekulare Genetik (Berlin) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte durch Abgleich mit dem Tabak Plastom und mit der jeweiligen Gensequenz inklusive Veränderungen mithilfe des Integrated Genome Browser Version 6.1 bzw. 6.7 (Affymetrix) wie in Zhelyazkova *et al.* (2012b) erläutert. Dabei erfolgte die Normalisierung der einzelnen *reads* für jede Mutante gegen die Gesamtzahl der kartierten Chloroplasten-*reads*, und zur Vereinfachung der Darstellung wurde die relative Anzahl der kartierten *reads* (tatsächliche *reads* : 100) gegen die Plastompositionen bzw. *aadA*-Sequenz aufgetragen. Auch die Annotation von Transkriptionsstartstellen (TSS) wurde wie in Zhelyazkova *et al.* (2012b) beschrieben durchgeführt. Die Analyse potentieller NEP- und PEP-Promotoren erfolgte manuell innerhalb des Sequenzbereichs -50 bis -1 relativ zur TSS. Dabei wurden YRTa-Motive 2-5 Nukleotide und -10-Boxen 3-9 Nukleotide stromaufwärts der TSS erwartet (Sun *et al.*, 1989; Swiatecka-Hagenbruch *et al.*, 2007; Zhelyazkova *et al.*, 2012b), sowie -35-Boxen 15-21 Nukleotide stromaufwärts des -10-motivs (Harley und Reynolds, 1987). Für die -10- und -35-Boxen (TATAaT und TTGaca) wurde eine Ähnlichkeit von 50% zum gesamten Konsensus und 60% Übereinstimmung mit den überrepräsentierten Nukleotiden des Konsensus erwartet.

Tab. 9: Oligonukleotide zur Überprüfung der DNA-Kontamination

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Ziel
P3	CGAAAGGTTAGAAATCAACAAAA	<i>N. t. PpsbD</i>
P4	GCTCCAATTTTCATCTCTATC	<i>N. t. PpsbD</i>

2.2.10 Proteine

2.2.10.1 Isolation von Proteinen

Zur Isolation von Proteinen aus Pflanzengewebe wurde das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Proteinextraktionspuffer gemischt (ca. 300 mg/ 1 ml). Durch Zentrifugation bei 16000g für 10 min wurden z.T. die unlöslichen von den löslichen Zellbestandteilen getrennt. Zur Solubilisierung von Membranproteinen wurde dem Extraktionspuffer 1 % Triton X-100 zugesetzt.

Proteinextraktionspuffer 100 mM Tris (pH 7,0), 10 % (w/v) Saccharose, 5 mM EDTA (pH 8,0), 40 mM β-Mercaptoethanol, 2 mM PMSF, 0,04 Vol.-% Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science)

Complete Protease Inhibitor
Cocktail Stammlösung 1 Tablette in 2 ml *A. bidest*

2.2.10.2 Quantifizierung von Proteinlösungen

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen erfolgte nach Bradford (1976) mit dem Bio-Rad Protein Assay entsprechend den Angaben des Herstellers im Abgleich mit einer BSA-Eichgerade. Zur photometrischen Messung diente das Novaspec® II Spectrophotometer (Pharmacia Biotech).

2.2.10.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen wurde nach Laemmli (1970) in einer Hoefer™ SE 260 Kammer (Amersham Biosciences) durchgeführt. Proteinlösungen wurden mit 1x Ladepuffer gemischt, bei 65 °C für 20 min denaturiert und in Standard SDS-Polyacrylamidgelen (5 % Sammelgel, 7,5-15 % Trenngel) parallel zu einem Größenstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas) bei 150 V aufgetrennt.

1x Ladepuffer	62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8), 10 % (w/v) Glycerol, 2 % (w/v) SDS, 5 % β -Mercaptoethanol, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
Acrylamid/Bis-Acrylamid-Stammlösung	Gel 30 (37,5:1, Roth)
Sammelgel	5 % Acrylamid, 125 mM Tris/HCL (pH 6,8), 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,1 Vol.-% TEMED
Trenngel	7,5-15 % Acrylamid, 375 mM Tris/HCL (pH 8,8), 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,1 Vol.-% TEMED
Laufpuffer	25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
Coomassie-Färbelösung	0,05 % (w/v) Coomassie R-250, 0,125 Vol.-% Isopropanol, 0,05 % Vol.-% Essigsäure
Entfärbelösung	25 Vol.-% Isopropanol, 10 Vol.-% Essigsäure

Die Proteingele wurden anschließend gefärbt (1 h Inkubation in Coomassie-Färbelösung, 2 h Entfärben) oder für den Western-Transfer verwendet.

Eine Silberfärbung von Gelen erfolgte mit dem SilverQuest™ Kit (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers. Die Kolloidale Coomassie-Färbung wurde mit Roti®-Blue Colloidal Coomassie staining (Roth) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.10.4 Protein-Transfer und Immunodetektion (*Western Blot*)

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mithilfe einer Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) in Transferpuffer bei 25 V für 1 h auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond™-C Extra, Amersham Biosciences) transferiert. Durch anschließende Ponceau-Färbung (5 min Inkubation mit Ponceaulösung, Entfärben mit *A. bidest*) erfolgte eine Qualitätskontrolle und Mengenstandardisierung.

Die Membran wurde 1 h oder üN in Blockierungslösung inkubiert. Die anschließende Inkubation mit dem primären Antikörper (in TBST mit 1 % Milchpulver) erfolgte für 1,5 h. Nach zwei 15-minütigen und zwei 5-minütigen Waschschritten in TBST wurde die Membran mit dem HRP-konjugierten, sekundären Antikörper für 1 h inkubiert. Nach drei 15-minütigen Waschschritten in TBST erfolgte die Detektion des Sekundär-Antikörpers durch Chemilumineszenz (Amersham™ ECL Advance™ Western Blotting Detection Kit, GE Healthcare). Die Visualisierung der Signale erfolgte entweder mit Röntgenfilmen (Hyperfilm™ MP, Amersham Biosciences) oder mit dem Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad) und der Image Lab™ Software (Bio-Rad).

Transferpuffer	48 mM Tris-Base, 39 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,0375% (w/v) SDS
Ponceaulösung	30 % (w/v) Trichloressigsäure, 30 % (w/v) 5-Sulfosalicylsäure, 2 % (w/v) Ponceau S (Merck)
Blockierungslösung	5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST
TBST	100 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20

2.2.10.5 Immunopräzipitation (IP) für RIP-Chip und Dot Blot

Alle Zentrifugationen und Inkubationen wurden bei 4 °C durchgeführt. Eingesetzt wurde das Stroma von 3xFLAG-RpoTp bzw. 3xFLAG-RpoTmp. Als Kontrolle wurde entweder eine IP mit Wt-Stroma und Anti-FLAG-Antikörper durchgeführt oder eine IP mit 3xFLAG-RpoTp-Stroma mit Anti-HA-Antikörper. Es wurden je Immunopräzipitation 200 µl (0,5 – 1 mg Protein) *Arabidopsis*-Stroma mit 1 µl RiboLock™ RNase-Inhibitor (Fermentas) versetzt und zur Entfernung restlicher Membranbestandteile 5 min bei 16000g zentrifugiert. Pro IP-Reaktion wurden 50 µl Dynabeads® Protein G (Invitrogen) dreimal mit Co-IP-Puffer gewaschen und in 100 µl Co-IP-Puffer⁺ aufgenommen. Das Stroma wurde 10 min mit 25 µl Dynabeads inkubiert. Nach Entfernung der Dynabeads mittels MagnaRack™ (Invitrogen) wurden 2 – 5 µl (5 µg) Antikörper (Anti-FLAG bzw. Anti-HA) zugegeben und das Gemisch für 1 h auf einem Rotations-Inkubator (Intelli-Mixer, neoLab®, Programm F1 bei 30 rpm) inkubiert. Anschließend wurden 75 µl Dynabeads zugesetzt und eine weitere Stunde inkubiert. Der Überstand wurde von den Dynabeads (Pellet) befreit. Das Pellet wurde dreimal in jeweils 5 Vol. Co-IP-Puffer⁺ gewaschen. Aus Überstand und Pellet wurde durch Extraktion mit Roti®-Phenol (Roth) und Ethanol fällung RNA isoliert, in 20 µl *A. bidest* resuspendiert und für den RIP-Chip (s. 2.2.11) oder Dot Blot (s. 2.2.9.14) weiterverwendet.

Von Stroma, Überstandsfraktion und Pellet wurden Aliquots für die Analyse durch Proteingelelektrophorese (s. 2.2.10.3) entnommen.

Co-IP-Puffer	20 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 2 mM MgCl ₂ , 0,5 Vol.-% Nonidet P-40,
Co-IP-Puffer ⁺	Co-IP-Puffer mit 5 µg/ml Aprotinin und 0,1 Vol.-% RiboLock™ RNase-Inhibitor

2.2.10.6 IP zur Co-Präzipitation potentiell interagierender Proteine

Tabak: IP mit HFS-/ VMF-Tp

200-500 µl Stroma der jeweiligen 14 d bis 28 d alten transgenen Pflanze und des Wildtyps wurden entweder mit 5 µg Anti-FLAG bzw. Anti-HA Antikörper für 1-3 h oder üN und anschließend mit 50-100 µl in Co-IP-Puffer 1 äquilibrierter rec-Protein-A-Sepharose® 4B (Invitrogen) üN oder für 3 h bei 4 °C oder RT auf einem Intelli-Mixer (neoLab®) inkubiert, oder das Stroma wurde zuerst mit der Sepharose und danach mit dem Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Matrix bei 380g für je 5 min mit je 10 Vol. Co-IP-Puffer 1 erfolgte die Elution der Proteine mit 1x Ladepuffer (s. 2.2.10.3) bei 95 °C für 10 min.

Arabidopsis: IP mit 3xFLAG-RpoTp/ Tmp

100-300 µl Stroma der 14 d alten transgenen Linien sowie des Wildtyps wurden entweder erst mit 5 µg Anti-FLAG oder Anti-HA Antikörper für 1-3 h oder üN und anschließend mit 50-100 µl in Co-IP-Puffer 1 oder Co-IP-Puffer 2 äquilibrierter rec-Protein-A-Sepharose® 4B (Invitrogen) üN oder für 3 h bei 4 °C oder RT auf einem Intelli-Mixer (neoLab®) inkubiert, oder das Stroma wurde erst mit der Sepharose und danach mit dem Antikörper inkubiert. Alternativ wurde das Stroma mit 50-100 µl in Co-IP-Puffer 1 bzw. 2 äquilibriertem Anti-FLAG® M2 Affinity Gel (Sigma) für 3 h oder üN bei 4 °C oder RT inkubiert. Die jeweils verwendete Matrix wurde danach dreimal mit je 10 Vol. Co-IP-Puffer 1 bzw. 2 gewaschen. Die Proteine wurden mit 1x Ladepuffer (s. 2.2.10.3) eluiert.

Die Analyse der jeweiligen Eluate erfolgte mittels SDS-PAGE. Dafür wurden entweder Standardgele verwendet (s. 2.2.10.3) oder es wurden Gradientengele aus 15 %iger und 10 %iger SDS-Trenngel-Lösung gegossen. Die Gele wurden nach der Elektrophorese mit Silber oder kolloidalem Coomassie gefärbt (s. 2.2.10.3).

Co-IP-Puffer 1	25 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 Vol.-% Nonidet P-40, 0,04 Vol.-% Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science)
Co-IP-Puffer 2	50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 Vol.-% Nonidet P-40, 0,04 Vol.-% Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science)

Hitze-Denaturierung von HFS-/ VMF-Tp

100 µl Stroma wurden für 10 min bei 85 °C inkubiert. Nach Abkühlen erfolgte erst die Inkubation mit 5 µg Anti-FLAG bzw. Anti-HA Antikörper für 3 h bei 4 °C und anschließend mit 100 µl rec-Protein-A-Sepharose üN bei 4 °C. Die Proteine wurden nach dreimaligem Waschen mit IP-Puffer 1 mit 1x Ladepuffer (s. 2.2.10.3) eluiert.

Harnstoff-Denaturierung von HFS-/ VMF-Tp

100 µl Stroma wurden mit 200 µl 5 M Harnstoff für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Stroma im Dialyseschlauch (*Snake Skin*) gegen 1 l Lysepuffer (s. 2.2.6) bei 4 °C üN dialysiert. Danach erfolgte die IP mit Inkubation mit Anti-FLAG Antikörper für 3 h und mit rec-Protein-A-Sepharose üN bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit IP-Puffer 1 wurden die Proteine mit 1x Ladepuffer (s. 2.2.10.3) eluiert.

2.2.10.7 Heterologe Expression von Epitop-markierten RpoTs aus *N. t.* und *A. t.*

2.2.10.7.1 Plasmide zur heterologen Expression Epitop-markierter RpoTs

Die Plasmide zur Expression 6xHis-fusionierter *Arabidopsis* RpoTs (pCold-His-RpoTp, pCold-His-RpoTnp und pCold-His-RpoTm) wurden von Alexandra-Viola Bohne im Rahmen ihrer Dissertation kloniert (Bohne, 2009). Entsprechende Plasmide zur Expression der Tabak Phagentyp-Polymerasen wurden ebenfalls von Alexandra-Viola Bohne hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Als weiteres System zur Expression von 6xHis-Fusionsproteinen wurde pJS-HisEx hergestellt. Hierfür wurde von Dr. Anne Karradt (HU Berlin/ Biochemie) der Vektor pBB14 zur Verfügung gestellt. In pBB14 wurde durch gezielte Mutagenese eine *NdeI*-Schnittstelle vor der für GST kodierenden Sequenz in pGEX-2TK eingeführt und die Nukleotidsequenz von *nblA* aus *Anabaena sp.* PCC 7120 *NdeI/NdeI* inseriert. Durch *NdeI/SmaI*-Verdau wurden *nblA*, GST-Sequenz, Thrombin- und Kinase-site entfernt, und die für den 6xHis-tag kodierende Sequenz (s. Anhang, Tab. A1) ligiert. Die Nukleotidsequenzen, welche für die Tabak und *Arabidopsis* RpoTp und RpoTnp kodieren, wurden mit den Oligonukleotiden GST-AtRpoTp_fw, GST-At/NtRpoTp_rev, GST-NtRpoTp_fw2, GST-NtRpoTp_rev2, GST-AtRpoTnp_fw, GST-AtRpoTnp_rev, GST-NtRpoTnp_fw, GST-NtRpoTnp_rev (s. Anhang, Tab. A1) aus den jeweiligen pCold-basierten Expressionsplasmiden amplifiziert und *SmaI/SmaI* in pJS-HisEx kloniert. Die Position der Vorwärts-primer wurde so gewählt, dass lediglich Nukleotide N-terminal wegfallen, die für das Transitpeptid kodieren, sodass eine

vollständige, funktionelle Polymerase exprimiert werden kann. Die resultierenden Plasmide pJS55, pJS56, pJS57 und pJS58 sind in Tab. 2 (s. 2.1.4) näher beschrieben.

Dieselben PCR-Produkte wurden außerdem zur Ligation mit dem *SmaI/SmaI*-verdauten pGEX-2TK verwendet. Die resultierenden Vektoren pJS19, pJS20, pJS53 und pJS54 (s. 2.1.4, Tab. 2) dienen der heterologen Expression von Glutathion-S-Transferase (GST)-fusionierten RNA-Polymerasen.

2.2.10.7.2 Überexpression Epitop-markierter RpoTs

Expression mit dem pCold-System

Die Expression der 6xHis-markierten RNA-Polymerasen mit dem pCold-System erfolgte wie in Böhne (2009) beschrieben. Als Kontrolle für spätere *pulldown assays* wurden *E. coli* BL21-Zellen mit pCold DNAI transformiert und für die Expression und Reinigung eingesetzt. Die Zellen wurden nach Expression bei 5000g (Megafuge 1.0 R, Heraeus) geerntet. Für eine Analyse der Expression mittels SDS-PAGE (s. 2.2.10.3) wurden der Kultur vor der Induktion und nach der Expression je 200 µl entnommen, 1 min bei 16000g zentrifugiert, und das Pellet in 50 µl 1x Ladepuffer resuspendiert.

Expression mit dem pGEX-System bzw. pJS-HisEx-System

Für die Überexpression der 6xHis-RpoTs mit dem pJS-HisEx-System und für die Expression der GST-Fusionsproteine und des GST wurden die mit pJS55/pJS56/pJS57/pJS58 bzw. mit pJS19/pJS20/pJS53/pJS54 und pGEX-2TK transformierten *E. coli* BL21-Zellen in einer 5 ml-Vorkultur in LB_{Amp/Cm} (100 µg/ml Ampicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol) üN bei 37 °C und 220 rpm angezogen. 500 ml LB_{Amp}-Hauptkultur wurden durch Zugabe der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 wachsen gelassen. Nach Zugabe von 1 mM IPTG wurde die Kultur bei 18 °C für 20 h bei 220 rpm geschüttelt und anschließend durch Zentrifugation für 15 min bei 6000g (Megafuge 1.0 R, Heraeus) und 4 °C geerntet. Für die Analyse der Expression mittels SDS-PAGE (s. 2.2.10.3) wurden der Kultur vor der Induktion und nach der Expression je 200 µl entnommen, 1 min bei 16000g zentrifugiert, und das Pellet in 50 µl 1x Ladepuffer resuspendiert.

2.2.10.7.3 Reinigung Epitop-markierter RpoTs

Reinigung von 6xHis-Fusionsproteinen

Der Aufschluss der Zellen nach Expression mit dem pCold-System in Puffer A1, sowie die Reinigung mittels Affinitätschromatographie mit Ni²⁺-NTA-Agarose (Qiagen) mit den Puffern A2 bis AE erfolgten wie in Böhne (2009) beschrieben. Nach Einengen des Eluat-Volumens durch Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Devices (Ausschlussvolumen 50 kDa; Millipore) entsprechend den Herstellerangaben auf ca. 500 µl erfolgte ein Pufferwechsel durch dreimaliges Zugeben von je 1 Vol. Puffer AD und erneutes Zentrifugieren. Im letzten Zentrifugationsschritt wurde das Volumen der Proteinlösung auf ca. 100 µl eingengt und die Lösung bei -20 °C für maximal sechs Wochen gelagert.

Zellaufschluss und Reinigung der mit dem pJS-HisEx-System exprimierten, rekombinanten 6xHis-Polymerasen erfolgte wie für die durch die pCold-basierten Plasmide exprimierten 6xHis-RpoTs beschrieben.

Puffer A1	100 mM Tris/HCl (pH 7,8); 300 mM NaCl; 5 mM Imidazol
Puffer A2	Puffer A1; 1 mM PMSF; 1 mM Benzamidin; 0,5 mM DTT
Puffer A3	20 mM Tris/HCl (pH 7,0); 300 mM NaCl; 5 mM Imidazol
Puffer A4	20 mM Tris/HCl (pH 7,0); 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol
Puffer A5	20 mM Tris/HCl (pH 7,0); 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol
Puffer A6	20 mM Tris/HCl (pH 7,0); 300 mM NaCl; 30 mM Imidazol
Puffer AE	20 mM Tris/HCl (pH 7,0); 300 mM NaCl; 100 mM Imidazol
Puffer AD	20 mM Tris/HCl (pH 7,8); 100 mM NaCl; 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT; 50% (v/v) Glycerin

Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Für die Reinigung der GST-fusionierten RpoTs wurden die Zellen in 8-10 ml GST-RE-Puffer resuspendiert und auf mehrere 2 ml-Eppendorfgefäße, die je ca. 1 g Glasperlen (Durchmesser 0,17-0,18 mm; Sartorius) enthielten, so aufgeteilt, dass das Verhältnis Glasperlen zu Suspension etwa 1:1 betrug. Der Aufschluss der Zellen erfolgte bei 4 °C und maximaler Schwingfrequenz für 10 min in der Zelmühle (Modell MM2, Retsch). Nach Zentrifugation bei 4 °C und 6000g für 10 min wurden die Überstände gesammelt und zur Abtrennung restlicher Glasperlen und unlöslicher Zellbestandteile bei 4 °C und 6500g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend mit 100 µl in GST-RE-Puffer äquilibrierter Glutathione Sepharose™ 4B (GE Healthcare) üN bei 4 °C auf einem Intelli-Mixer (neoLab®) inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 1000g wurde der Rohextrakt verworfen und die Glutathion Sepharose in 1 ml GST-RE-Puffer aufgenommen, in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt und erneut sedimentiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit je 500 µl Puffer. Zur Elution der exprimierten, rekombinanten Proteine wurde die Matrix zweimal für 20 min mit je 200 µl Glutathionlösung schüttelnd inkubiert. Die Überstände wurden vereinigt und mittels Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Devices (Ausschlussvolumen 50 kDa; Millipore) bzw. für GST mit Microcon® YM-10 Centrifugal Filter Devices (Ausschlussvolumen 10 kDa; Millipore) nach Herstellerangaben eingeengt und durch dreimalige Zugabe von GST-Lagerpuffer umgepuffert. Die Proteinlösungen wurden bei -20 °C maximal sechs Wochen gelagert.

GST-RE-Puffer	50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 2 mM MgCl ₂ , 10 % (v/v) Glycerol; 0,04 Vol.-% Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science)
Glutathionlösung	40 mM reduziertes Glutathion in 50 mM Tris; pH 8,0
GST-Lagerpuffer	50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 50 % (v/v) Glycerol

2.2.10.8 Pulldown assays mit rekombinanten Epitop-markierten RpoTs

GST-pulldown assay

10 µg gereinigte GST-fusionierte RNA-Polymerase wurde entweder erst mit 20-50 µl in GST-RE-Puffer (s. 2.2.13.2) äquilibrierter Glutathione Sepharose™ 4B (GE Healthcare) für 1-3 h auf einem Intelli-Mixer (neoLab®) bei 4 °C oder bei RT inkubiert und dann mit 200-500 µl Tabak- bzw. *Arabidopsis*-Wildtypstroma 3 h oder üN inkubiert, oder das Protein wurde zuerst mit dem Stroma 3 h oder üN inkubiert und anschließend wurde die Sepharose üN oder für 1-3 h zugegeben. Danach wurde die Matrix dreimal mit jeweils 500 µl GST-RE-Puffer gewaschen. Die an die Glutathion Sepharose gebundenen Proteine wurden entweder

mit 40 mM Glutathionlösung eluiert, mit 2 Vol. Aceton üN bei -20 °C gefällt, zentrifugiert und das Pellet in 1x Ladepuffer aufgenommen, oder die Elution erfolgte durch direkte Zugabe von 1x Ladepuffer und Inkubation bei 95 °C für 10 min. Die Eluate wurden durch SDS-PAGE (s. 2.2.10.3) analysiert.

His-pulldown assay

Es wurden 10 µg gereinigte 6xHis-fusionierte RNA-Polymerase mit in Puffer A1 (s. Bohnen, 2009) äquilibrierter 100 µl Ni²⁺-NTA-Agarose (Qiagen) für 1-3 h bei 4 °C auf einem Intelli-Mixer (neoLab®) inkubiert. Dann folgte die Zugabe von 200-500 µl Tabak- bzw. *Arabidopsis*-Wildtypstroma und Inkubation üN. Die Agarose wurde je einmal mit jeweils 300 µl Puffer A3, A4 und A5 (s. 2.2.10.7.3) gewaschen. Die Elution der präzipitierten Proteine erfolgte mit Puffer AE (s. 2.2.10.7.3) und anschließender Acetonfällung üN oder mit 1x Ladepuffer für 10 min bei 95 °C. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE (s. 2.2.10.3) analysiert.

2.2.10.9 Massenspektrometrie: *peptide mass fingerprinting*

Die Analyse von aus SDS-Gelen ausgeschnittenen Protein-Banden mittels Massenspektrometrie (*peptide mass fingerprinting*) erfolgte in der AG von Prof. Dr. Steup (Universität Potsdam/ Institut für Biochemie und Biologie). Die Entfärbung der Gelstücke, der tryptische Verdau, die Extraktion der Peptide aus dem Gel, sowie die Vorbereitung und Durchführung der eigentlichen MS fanden unter Anleitung von Dr. Jörg Fettke und Sebastian Mahlow entsprechend den Protokollen in Gharahdaghi *et al.* (1999) und Shevchenko *et al.* (2006) statt.

2.2.11 RIP-Chip

RIP-Chips (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005) wurden wie folgt durchgeführt: Die Fluoreszenzmarkierung der copräzipitierten RNA (Pellet-RNA mit Cy5 und Überstands-RNA mit Cy3) erfolgte mit dem ULS™ aRNA Labeling Kit (Kreatech). Dafür wurden 17 µl der Pellet-RNA (ca. 250 bis 350 ng) und 1 µg der Überstands-RNA mit 1 µl Farbstoff und 2 µl 10x Labeling Buffer gemischt, 15 min bei 85 °C inkubiert, und nicht eingebaute Fluoreszenzfarbstoffe wurden durch Gelfiltrationssäulchen entfernt. Die markierten RNAs wurden mit 2x Hybridisierungsmix gemischt, denaturiert und dann auf einen das *Arabidopsis*-Plastom überspannenden *microarray* aufgetragen. Dieser *microarray* wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Schmitz-Linneweber zur Verfügung gestellt und ist in der Dissertation von Christiane Kupsch (2012/2013) genauer beschrieben. Die auf den *array* gedruckten DNAs wurden zunächst durch UV-Licht auf der Oberfläche fixiert. Dann wurde der Chip 1 h in Prähybridisierungslösung inkubiert, in *A. bidest* und Isopropanol gewaschen, getrocknet und schließlich für die Hybridisierung mit Überstands- und Pellet-RNA in Corning® Microarray Hybridization Chambers bei 42 °C üN eingesetzt. Anschließend wurde der *microarray* jeweils 10 min in den folgenden Lösungen bei RT gewaschen: 2x SSC/ 0,2 % SDS, 1x SSC, 0,2x SSC und 0,05x SSC. Nach Einlesen der Signale mit dem ScanArray G_X PLUS (Software: ScanArray Express; Perkin Elmer) wurden die Rohdaten mit der Software GenePix Pro7 (Axon) extrahiert und ausgewertet. Dazu wurden für jede IP (eigentlicher Versuch und Kontroll-IP) die Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Punkte aus Pellet zu Überstand (rote zu grüner Fluoreszenz) ermittelt. Diese Verhältnisse wurden dann gegen die Position des zugehörigen DNA-Bereichs auf dem Plastom aufgetragen, allerdings nur für diejenigen Bereiche bei denen mehr als die Hälfte der Signale für den

jeweiligen Bereich den Kriterien wie in Schmitz-Linneweber *et al.* (2005) und Zoschke *et al.* (2010) beschrieben standhielten.

2x Hybridisierungsmix	0,2 % (w/v) SDS, 10x SSC, 50 % (v/v) Formamid
Prähybridisierungslösung	1 % (w/v) BSA, 0,1 % (w/v) SDS, 5x SSC

2.2.12 Unspezifische *in vitro* Transkription

Für die unspezifische *in vitro* Transkription mit heterolog exprimierten, affinitätsgereinigten Phagentyp-RNA-Polymerasen enthielt ein 15 µl- Reaktionsansatz 10 mM DTT, 500 µM ATP, CTP und GTP, 25 µM UTP, 10 µCi, 20 U RiboLock™ RNase-Inhibitor (Fermentas), 1 µl Kalbs-Thymus-DNA, sowie 1 µl Polymerase in Transkriptionspuffer. Nach Inkubation bei 30 °C für 30 min wurde die Reaktion auf Eis gestoppt. Je 2,5 µl wurden auf fünf DAE 81 Membranen pipettiert und trocknen gelassen. Zwei Membranen wurden zur Messung der Gesamtaktivität genutzt, die übrigen drei Membranen wurden dreimal je 10 min in 0,21 M NaH₂PO₄ gewaschen, mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit in Szintillationsröhrchen überführt und im Szintillations-Zähler LS6000SC (Beckman) zur Ermittlung der Radioaktivität in cpm vermessen. Als Kontrollen wurden Reaktionsansätze ohne Polymerase und mit 4 U T7 RNA Polymerase (Ambion) mitgeführt.

10x Transkriptionspuffer	400 mM Tris/HCl (pH 7,9), 100 mM NaCl, 60 mM MgCl ₂ , 20 mM Spermidin
--------------------------	---

2.2.13 Spezifische *in vitro* Transkription

Die spezifische *in vitro* Transkription erfolgte wie in Kühn *et al.* (2007) beschrieben. Als Matrize wurde der Vektor pKL23-Patp8-2 verwendet, welcher die Sequenz des *atp8*-Promotors Patp8-228/226 enthält.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der entwicklungsspezifischen Rolle von NEP in Tabak

3.1.1 Austausch Polymerase-spezifischer Promotoren

Die meisten Haushaltsgene in Chloroplasten höherer Pflanzen besitzen sowohl NEP- als auch PEP-Promotoren wie beispielsweise *rrn16* in Tabak (Vera and Sugiura, 1995; Allison *et al.*, 1996). Andere Gene wie *rpoB* und *accD* werden ausschließlich von NEP transkribiert (Hajdukiewicz *et al.*, 1997; Silhavy und Maliga, 1998; Swiatecka-Hagenbruch *et al.*, 2007), sodass in späteren Entwicklungsstadien NEP ausreichend Transkripte zur Verfügung stellen muss. Um die entwicklungsspezifische Rolle von NEP zu untersuchen wurde ein transplastomischer Ansatz gewählt. Es wurden in *N. tabacum* NEP-Promotoren durch Mutagenese verändert mit dem Ziel sie auszuschalten, bzw. durch einen PEP-Promotor ersetzt, um die entwicklungsabhängige Bedeutung von NEP zu eruieren. Für die stabile Transformation von Tabak-Plastiden (Svab *et al.*, 1990a) wurden Transformationsvektoren auf Goldpartikel präzipitiert, welche mittels *particle gun* auf sterile Tabakblätter geschossen wurden. Nach Freisetzen der Plasmid-DNA in den Plastiden erfolgt die Integration der erwünschten Sequenzen durch homologe Rekombination, wobei die originalen Sequenzen an den entsprechenden Stellen des Plastoms ersetzt werden. Findet die Zell- und Chloroplastenteilung unter Selektionsdruck statt, segregieren die Transplastome und verdrängen die Wildtyp-Plastome. Zellen mit Chloroplasten, die Transplastome mit dem Selektionsmarker *aadA*, welcher Resistenz gegen den plastidären Translationsinhibitor Spectinomycin vermittelt, besitzen, bringen schließlich grüne Sprösslinge hervor.

Die Vektoren pJS32b, pJS33b und pJS40 wurden zur Untersuchung der Transkription von *accD* kloniert. pJS32b (s. Abb. 5A) diente dem Ersatz des Typ-I NEP-Promotors *PaccD*-129 durch den PEP-Promotor *PatpB*-255, wobei der vier Nukleotide vom -35-Motiv stromaufwärts gelegene Typ-I NEP-Promotor *PatpB*-289 durch Veränderung des Motivs von CATA nach GTAT im Rahmen der Klonierungen ausgeschaltet wurde.

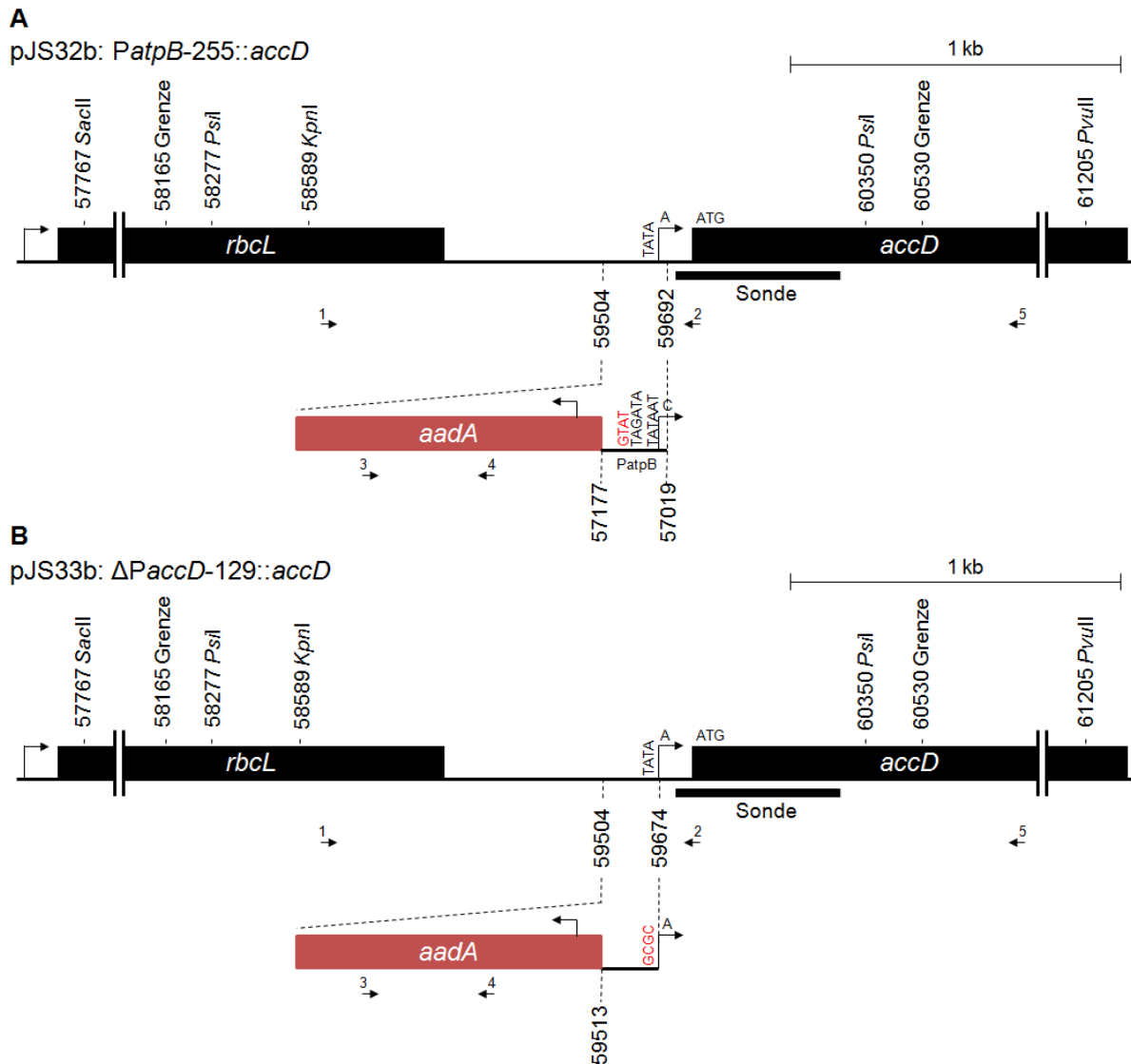


Abb. 5: Genkarte der *accD*-Region und Beschreibung der Transformationsvektoren pJS32b und pJS33b (s. 2.1.4, Tab. 2) sowie der abgeleiteten transplastomischen Linien *PatpB-255::accD* (A) und $\Delta PaccD-129::accD$ (B). Schwarze Kästen symbolisieren Exons (Transkriptionsrichtung nach rechts). Die schwarze Linie kennzeichnet nichtkodierende Bereiche. Die Zahlen entsprechen den Positionen auf dem Tabak-Plastom (GenBank-Zugang: NC_001879). Sequenzen vor schwarzen Pfeilen = Promotormotive von *PaccD-129* bzw. *PatpB-289* und *PatpB-255*, rote Nukleotide = veränderte Promotormotive von *PaccD-129* bzw. *PatpB-289*, Schwarze Pfeile = Transkriptionsinitiationsstelle und -richtung, Grenze = Rekombinationsgrenzen des Plasmidfragments im Transformationsvektor, *aadA* = Selektionsmarker. Die Position der für die Southern Blot Analyse verwendeten DNA-Sonde (s. 2.2.9.15, Tab. 4) sowie relevanter Restriktionsschnittstellen sind gezeigt. Pfeile mit Zahlen kennzeichnen Oligonukleotide für PCR-Analysen (s. Anhang, Tab. A1). Ein Maßstab ist eingezeichnet.

Durch Transformation des Vektors pJS33b (s. Abb. 5B) sollte der *accD*-Promotor *PaccD-129* geschwächt werden. Dazu wurde das Promotormotiv von TATA nach GCGC geändert. Als Kontrollvektor zur Überprüfung des Einflusses des Resistenzmarkers wurde pJS40 (s. 2.1.4, Tab. 2) erzeugt. Allerdings brachte die Transformation mit diesem Vektor keine transplastomischen Pflanzen hervor. Es wurden die transplastomischen Tabaklinien *PatpB-255::accD* (kurz: PEP/*accD*) und $\Delta PaccD-129::accD$ (kurz: Δ NEP/*accD*) erzeugt.

Der Transformationsvektor pJS36b (s. Abb. 6) diente dem Ersatz des Typ-I NEP-Promotors *PrpoB*-345 durch den PEP-Promotor *PatpB*-255, wobei *PatpB*-289 ausgeschaltet wurde. Die erzeugte transplastomische Linie *PatpB*-255::*rpoB* wird nachfolgend PEP/*rpoB* genannt. Der abgeleitete Kontrollvektor pJS44 (s. 2.1.4, Tab. 2) brachte keine transplastomischen Pflanzen hervor.

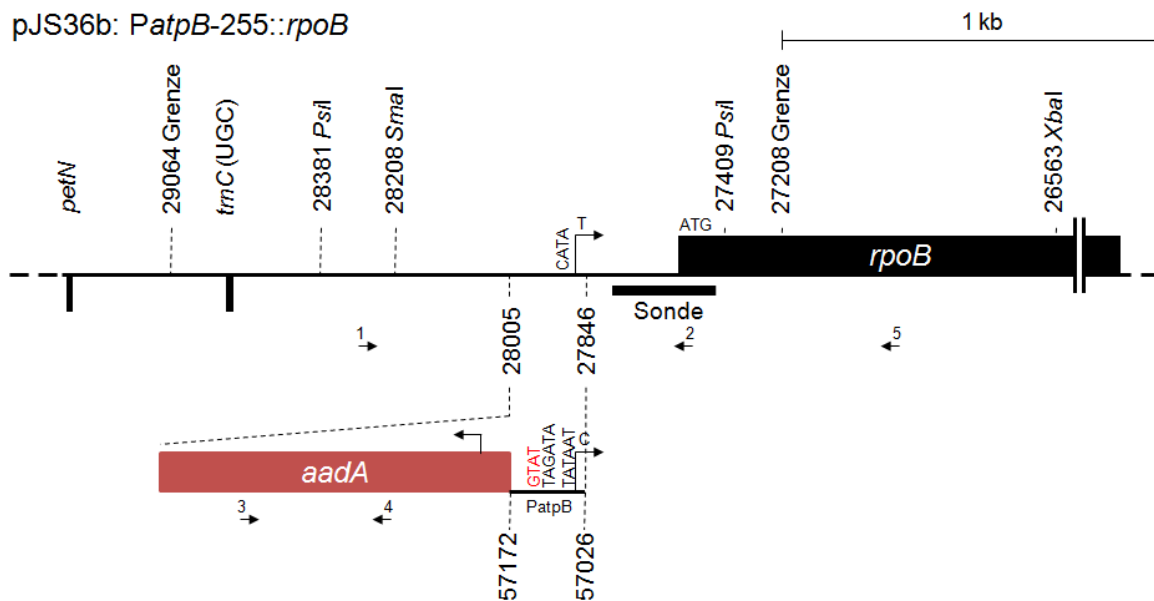


Abb. 6: Genkarte der *rpoB*-Region und Beschreibung des Transformationsvektors pJS36b (s. 2.1.4, Tab. 2), sowie der abgeleiteten transplastomischen Linie (*PatpB-255::rpoB*). Der schwarze Kasten symbolisiert den kodierenden Bereich von *rpoB* (Transkriptionsrichtung nach rechts). Die schwarze Linie kennzeichnet nichtkodierende Bereiche. Die Zahlen entsprechen den Positionen auf dem Tabak-Plastom (GenBank-Zugang: NC_001879). Sequenzen vor schwarzen Pfeilen = Promotormotive von *PrpoB-345* bzw. *PatpB-289* und *PatpB-255*, rote Nukleotide = verändertes Promotormotiv von *PatpB-289*, Schwarze Pfeile = Transkriptionsinitiationsstelle und –richtung, Grenze = Rekombinationsgrenzen des Plastomfragments im Transformationsvektor, *aadA* = Selektionsmarker. Position der für die *Southern Blot* Analyse verwendeten DNA-Sonde (s. Kap. 2.2.9.15, Tab. 4) sowie relevanter Restriktionsschnittstellen sind gezeigt. Pfeile mit Zahlen kennzeichnen Oligonukleotide für PCR-Analysen (s. Anhang, Tab. A1). Ein Maßstab ist eingezeichnet.

Mittels pJS51 (s. Abb. 7) sollte der Typ-I NEP-Promotor *Prrn16-64* durch Mutagenese des Promotormotivs von CTTG zu GCGC ausgeschaltet werden, sodass die Transkription von *rrn16* ausschließlich vom PEP-Promotor *Prrn16-113/114* erfolgen kann. Die erzeugte Linie $\Delta Prrn-64::rrn16$ wird nachfolgend als $\Delta NEP/rrn16$ bezeichnet. Sowohl ein abgeleiteter Kontrollvektor (pJS52, s. 2.1.4, Tab. 2) als auch pJS49 (s. 2.1.4, Tab. 2), welcher dem Ausschalten von *Prrn16-113/114* dienen sollte, brachten keine transplastomischen Pflanzen hervor.

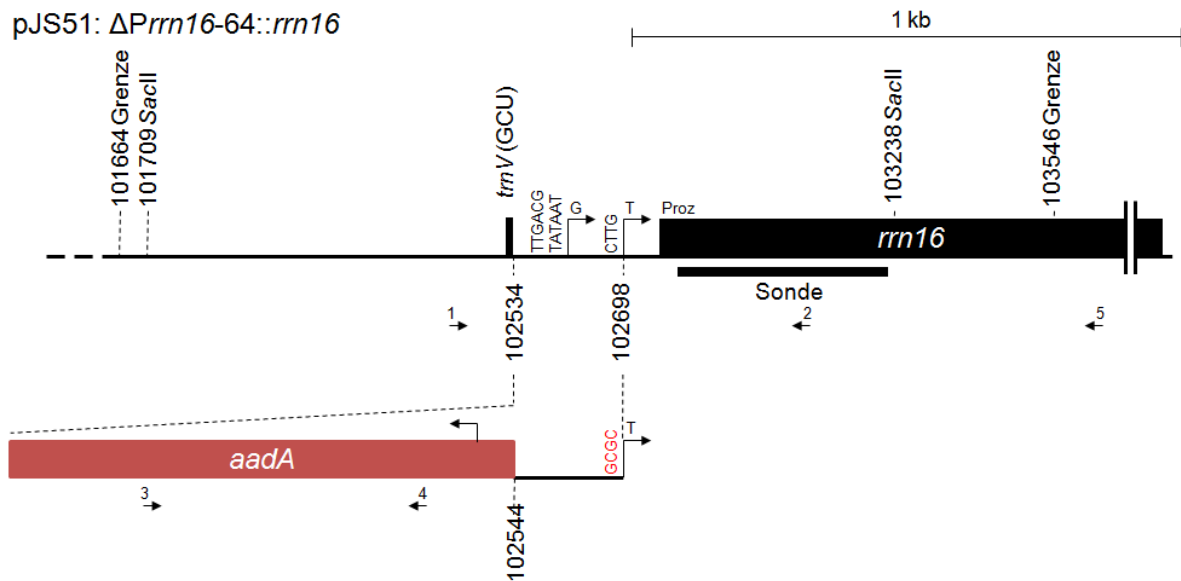


Abb. 7: Genkarte der *rrn16*-Region und Beschreibung des Transformationsvektors pJS51 (s. 2.1.4, Tab. 2) sowie der abgeleiteten (\rightarrow) transplastomischen Linie ($\Delta Prrn16-64::rrn16$). Der schwarze Kasten symbolisiert den kodierenden Bereich von *rrn16* (Transkriptionsrichtung nach rechts). Die schwarze Linie kennzeichnet nichtkodierende Bereiche. Die Zahlen entsprechen den Positionen auf dem Tabak-Plastom (GenBank-Zugang: NC_001879), wobei jeweils nur eine der zwei Positionen angegeben ist. Sequenzen vor schwarzen Pfeilen = Promotormotive von *Prrn16-113/114* und *Prrn16-64*, rote Nukleotide = verändertes Promotormotiv von *Prrn16-64*, Schwarze Pfeile = Transkriptionsinitiationsstelle und -richtung, Proz = Prozessierungsstelle der 16S rRNA, Grenze = Rekombinationsgrenzen des Plastomfragments im Transformationsvektor, *aadA* = Selektionsmarker. Position der für die *Southern Blot* Analyse verwendeten DNA-Sonde (s. 2.2.9.15, Tab. 4) sowie relevanter Restriktionsschnittstellen sind gezeigt. Pfeile mit Zahlen kennzeichnen Oligonukleotide für PCR-Analysen (s. Anhang, Tab. A1). Ein Maßstab ist eingezeichnet.

Da die Transformation von Tabak mit den jeweiligen Kontrollvektoren (pJS40, pJS44 und pJS52) trotz dreimaliger Wiederholung des Prozesses keine transplastomischen Linien hervorbrachte, wurde für sämtliche Versuche der Tabak Wildtyp zum Vergleich bzw. als Kontrolle herangezogen.

Des Weiteren wurden Vektoren kloniert, in denen der *non-consensus* NEP-Promotor *PclpP1-53* durch *PpsbA-85* ersetzt (pJS60) bzw. durch Veränderung des Motivs ausgeschaltet/geschwächt werden sollte (pJS61). Andere Plasmide sollten dem Ersatz des Promotors *PtrnE-UUC* durch *PrpoB-345* (pJS64) bzw. dessen Ausschalten (pJS66) dienen. Keiner dieser Vektoren brachte trotz mehrerer Versuche transplastomische Pflanzen hervor, sodass die nachfolgende Analyse der entwicklungsabhängigen Rolle von NEP ausschließlich anhand der Gene *accD*, *rpoB* und *rrn16* erfolgte.

3.1.2 Segregationsstatus der transplastomischen Pflanzen

Initial werden in den polyploiden Chloroplasten nur wenige Plastome transformiert. Erst im Zuge von Zell- und Chloroplastenteilung breiten sich die Transplastome aus. Daher wurde der Segregationsstatus der transplastomischen Pflanzen überprüft. Ziel war es homoplastomische

Pflanzen, die nur Transplastome enthalten, von heteroplastomischen Pflanzen, die Transplastome und wildtypische Plastome besitzen, zu unterscheiden. Nach drei bis vier Regenerationsrunden auf RMOP-Medium wurden die grünen Sprösslinge per PCR auf die Insertion der *aadA*-Kassette und der veränderten Promotorsequenzen getestet (s. Abb. 8). Hierfür wurden sowohl genspezifische als auch *aadA*-spezifische Oligonukleotide verwendet.

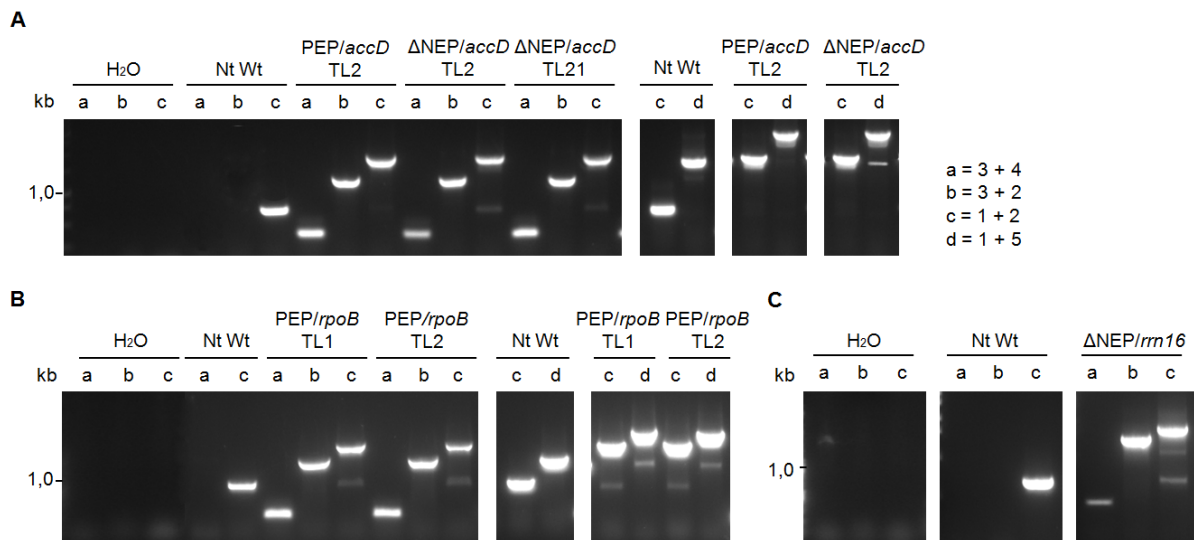


Abb. 8: PCR-Analyse der transplastomischen Pflanzen zur Überprüfung der Insertion der *aadA*-Kassette und der veränderten Promotorsequenzen für **A** *accD*, **B** *rpoB* und **C** *rrn16*. Es wurde Gesamt-DNA der transplastomischen Linien und des Wildtyps (Nt Wt) präpariert und für PCRs mit genspezifischen und *aadA*-spezifischen Oligonukleotiden eingesetzt. Es wurde jeweils eine Wasserkontrolle mitgeführt. a, b, c und d kennzeichnen verschiedene *primer*-Kombinationen wie in der Legende angegeben; 1 = genspezifischer Vorwärts-*primer* (s. Tab. A1; K-tpNt-*accD*-fw bzw. K-tpNt-*rpoB*-fw bzw. K-tpNt-*rrn16*-fw), 2 = genspezifischer Rückwärts-*primer* (s. Tab. A1; K-tpNt-*accD*-rev bzw. K-tpNt-*rpoB*-rev bzw. K-tpNt-*rrn16*-rev), 3 = *aadA*-spezifischer *primer* (s. Tab. A1; 78-3'SH3748), 4 = *aadA*-spezifischer *primer* (s. Tab. A1; pZ59 *aadA*_for), 5 = genspezifischer Rückwärts-*primer* (s. Tab. A1; K-tpNt-*accD*-rev2 bzw. K-tpNt-*rpoB*-rev2). Die PCR-Produkte wurden im 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Zur Größenstandardisierung wurde ein DNA-Marker (GeneRuler™ 100 bp DNA Plus Ladder, Fermentas) mit aufgetrennt. Marker-Banden sind gekennzeichnet. Banden der *primer*-Kombinationen b und c wurden ausgeschnitten, extrahiert und sequenziert. Erwartete PCR-Fragmentgrößen für **A**: Nt Wt c = 630 bp, Nt Wt d = 1705 bp, PEP/*accD* b = 1179 bp, PEP/*accD* c = 1796 bp, PEP/*accD* d = 2871 bp, ΔNEP/*accD* b = 1195 bp, ΔNEP/*accD* c = 1812 bp, ΔNEP/*accD* d = 2890 bp; für **B**: Nt Wt c = 817 bp, Nt Wt d = 1325 bp, PEP/*rpoB* b = 1410 bp, PEP/*rpoB* c = 2000 bp, PEP/*rpoB* d = 2505 bp; für **C**: Nt Wt c = 572 bp, ΔNEP/*rrn16* b = 1418 bp, ΔNEP/*rrn16* c = 1751 bp.

Die Positionen der verwendeten *primer* können in den Abbildungen 5, 6 und 7 nachvollzogen werden. Die Oligonukleotide 1-4 liegen innerhalb der Rekombinationsgrenzen des Transformationsvektors, während *primer* 5 außerhalb dieses Bereichs hybridisiert. Die PCR-Produkte wurden extrahiert und sequenziert. Die Größen aller in den PCRs erhaltenen Banden entsprachen den Erwartungen. Bei der Verwendung der genspezifischen Vorwärts- und Rückwärts-*primer* konnte außer bei PEP/*accD* auch in den transplastomischen Pflanzen eine schwache, wildtypische Bande detektiert werden, was auf restliche Wildtyp-Plastome

hindeutete. Resultierend aus den PCR-Screenings mit anschließenden Sequenzierungen wurden eine transgene Linie für PEP/*accD* (TL2), zwei Linien für Δ NEP/*accD* (TL2 und TL21), eine Linie für Δ NEP/*rrn16* und zwei Linien für PEP/*rpoB* (TL1 und TL2) ausgewählt, mit denen weitergearbeitet wurde. Die entsprechenden Sprösslinge wurden bewurzelt, auf Erde umgesetzt und durch *Southern Blot* Analyse auf den Segregationsstatus hin überprüft. Abbildung 9 zeigt die *Southern Blot* Analysen mit einer *accD*-spezifischen Sonde (Position s. Abb. 5) für PEP/*accD* TL2 und Δ NEP/*accD* TL2 und TL21. Die *PsiI*-verdaute Gesamt-DNA der Pflanzen der Parentalgeneration P (s. Abb. 9A) zeigte in der *Southern*-Hybridisierung neben der erwarteten Bande auch die Wildtyp-Bande. Die Pflanzen waren somit heteroplastomisch. Die von diesen Pflanzen gewonnenen Samen (F1) wurden auf Spectinomycin- und Streptomycin-haltigem Medium angezogen. Die Nachkommen heteroplastomischer Pflanzen spalten unter Selektionsdruck in grüne, weiße und grün-weiß gescheckte Keimlinge. Für PEP/*accD* TL2 wurden unter ca. 1000 kultivierten Keimlingen ausschließlich grüne gefunden, während bei Δ NEP/*accD* TL2 und TL21 auch gebleichte Keimlinge vorkamen. Es wurden jeweils grüne Keimlinge weiter kultiviert und wieder auf den Segregationsstatus hin getestet. Da die in den transplastomischen Pflanzen detektierte wildtypische Bande jeweils sehr schwach war, sollte überprüft werden, ob diese Bande möglicherweise auf Kopien von *accD* im Nukleus zurückzuführen ist. Dazu wurde die DNA mit den Enzymen *KpnI* und *PvuII* verdaut, wobei *PvuII* stromabwärts außerhalb der Rekombinationsgrenze des Vektors schneidet (s. Abb. 5). Die Pflanzen der F1-Generation zeigten trotz dieses alternativen Verdaus eine Wildtyp-Bande (s. Abb. 9B). Daher wurden steril angezogene, grüne Keimlinge erneut geschnitten und zwei Runden auf RMOP-Medium regeneriert. Nach Umsetzen auf Erde und erneuter *Southern Blot* Analyse (s. Abb. 9C) wurde keine bzw. eine sehr schwache Wt-Bande beobachtet. Dabei ist anzumerken, dass das Fehlen einer wildtypischen Bande in der PEP/*accD* Spur (s. Abb. 9C) eventuell darauf zurückzuführen war, dass offenbar weniger DNA aufgetrennt wurde als in den anderen Spuren. Von diesen Pflanzen wurde chloroplastidäre DNA präpariert, die weitestgehend frei von nukleärer DNA war (nicht gezeigt). Die *Southern*-Hybridisierung der verdauten cp-DNA (s. Abb. 9D) zeigte keine Wildtyp-Bande in den transplastomischen Pflanzen. Daher wurden von diesen Pflanzen Samen gewonnen (F2). Es wurden vor allem diese Samen für Versuche verwendet, sowie für die Gewinnung weiterer Samen (F3).

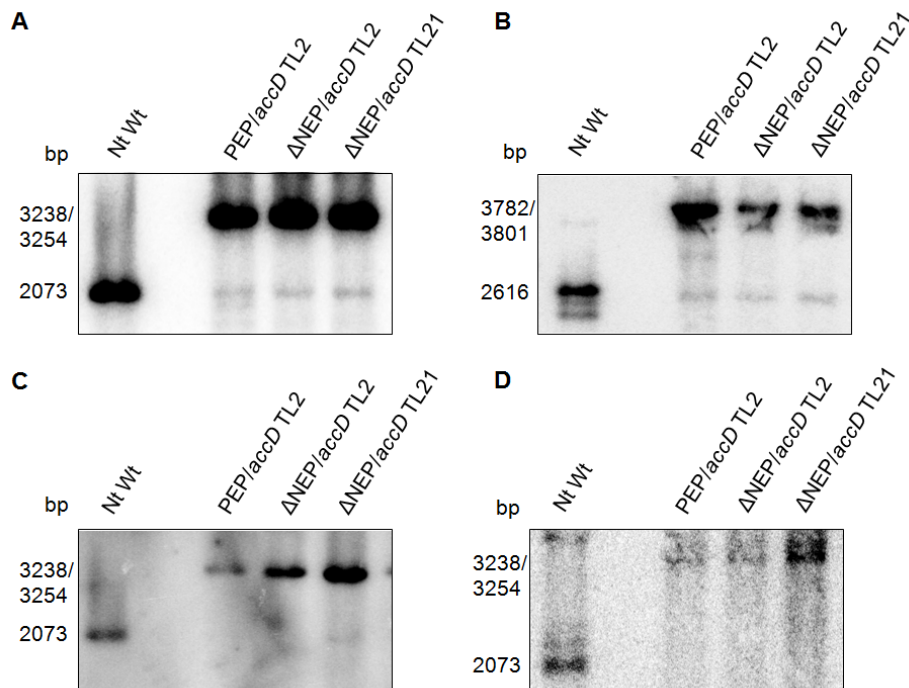


Abb. 9: *Southern Blot* Analysen zum Testen der Homoplastomie der transplastomischen Linien PEP/*accD* TL2 und Δ NEP/*accD* TL2 und TL21. Es wurde 10 μ g Gesamt-DNA oder Chloroplasten-DNA der transplastomischen Linien und des Wildtyps extrahiert, mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut, im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und auf Nylonmembranen transferiert. Die Hybridisierung der Membranen erfolgte mit einer *accD*-spezifischen DNA-Sonde (Position s. Abb. 5). Die Größen der zu erwartenden Banden sind gekennzeichnet. Dabei bezieht sich der erste, obere Wert auf PEP/*accD* und der zweite auf Δ NEP/*accD*. Nt Wt = Wildtypkontrolle. **A** *Pst*I-verdaute Gesamt-DNA der P-Generation. **B** *Kpn*I/*Pvu*II-verdaute Gesamt-DNA der F1-Generation. **C** *Pst*I-verdaute Gesamt-DNA der F2-Generation. **D** *Pst*I-verdaute, plastidäre DNA der F2-Generation.

Auch die F2- und F3-Pflanzen wurden mittels *Southern Blot* getestet (s. Abb. 10). Hierfür wurden die Restriktionsenzyme so gewählt, dass beide Enzyme (*Sac*II und *Pvu*II) außerhalb der Rekombinationsgrenzen des Vektors schneiden (s. Abb. 5).

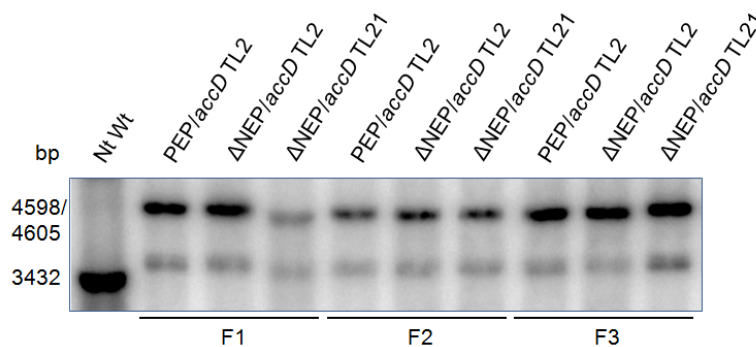


Abb. 10: Vergleichende *Southern Blot* Analyse der F1-, F2- und F3-Generation der transplastomischen Linien PEP/*accD* TL2 und Δ NEP/*accD* TL2 und TL21. 10 μ g Gesamt-DNA der Mutanten und des Wildtyps wurde mit *Sac*II und *Pvu*II verdaut. Die Hybridisierung der Membranen erfolgte mit einer *accD*-spezifischen DNA-Sonde. Die Größen der zu erwartenden Banden sind gekennzeichnet. Dabei bezieht sich der erste obere Wert auf PEP/*accD* und der zweite auf Δ NEP/*accD*. Nt Wt = Wildtypkontrolle.

Zwar war eine zusätzliche Bande für PEP/*accD* TL2 und Δ NEP/*accD* TL2 und TL21 zu erkennen, jedoch migrierte diese Bande oberhalb der Wildtyp-Bande. Auf Höhe der wildtypischen Bande war in den *accD*-Mutanten jeweils kein Signal detektierbar.

Die *Southern*-Hybridisierung mit einer *rpoB*-spezifischen DNA-Sonde (s. Abb. 6) der *PsiI*-verdauten Gesamt-DNA von PEP/*rpoB* TL1 und TL2 der Parentalgeneration (Abb. 11A) zeigte die erwartete Band von 2154 bp. Allerdings war auch auf Höhe der Wt-Bande ein sehr schwaches Signal zu erkennen. Dasselbe Ergebnis wurde auch für die F1-Generation erhalten.

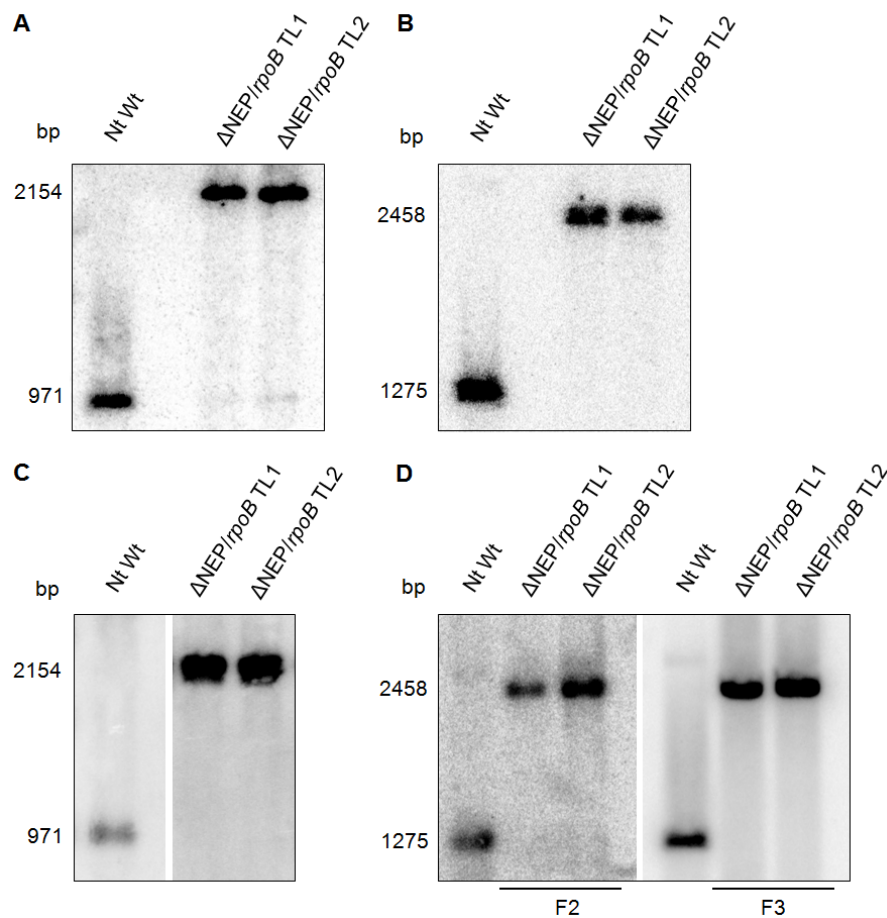


Abb. 11: *Southern Blot* Analysen zum Testen der Homoplastomie der transplastomischen Linien PEP/*rpoB* TL1 und TL2. 10 μ g Gesamt-DNA der Mutanten und des Wildtyps wurde nach Verdau im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und auf Nylonmembranen transferiert. Die Hybridisierung der Membranen erfolgte mit einer *rpoB*-spezifischen DNA-Sonde (Position s. Abb. 6). Die Größen der zu erwartenden Banden sind gekennzeichnet. Nt Wt = Wildtypkontrolle. **A** *PsiI*-verdauten Gesamt-DNA der P-Generation. **B** *SmaI/XbaI*-verdauten Gesamt-DNA der F1-Generation. **C** *PsiI*-verdauten Gesamt-DNA der F2-Generation. **D** *SmaI/XbaI*-verdauten Gesamt-DNA der F2- und F3-Generation.

Ein alternativer Verdau mit *SmaI* und *XbaI*, wobei *XbaI* außerhalb der Rekombinationsgrenze des Vektors schneidet (s. Abb. 6), wurde verwendet um zu untersuchen, ob die Wt-Bande in den transplastomischen Pflanzen auf *rpoB*-Kopien im Kern zurückzuführen ist. In der

entsprechenden *Southern*-Hybridisierung (Abb. 11B) war kein Wildtyp-Signal für PEP/*rpoB* detektierbar. Auch der *PsiI*-Verdau von DNA der F2-Generation (Abb. 11C) und der *SmaI/XbaI*-Verdau von DNA der F2- und F3-Pflanzen (Abb. 11D) ergab kein wildtypisches Signal. Die Pflanzen erschienen demnach homoplastomisch. Für die nachfolgenden Versuche wurden die Samen der F2-Generation verwendet.

Die Gesamt-DNA der transplastomischen Linie Δ NEP/*rrn16* wurde mit *SacII* verdaut. Die entsprechende *Southern*-Hybridisierung (Abb. 12) zeigte bereits in der P-Generation ausschließlich das zu erwartende Signal von 2707 bp Größe. Dies ließ darauf schließen, dass diese transplastomische Linie homoplastomisch war. Für die Versuche wurden somit die Samen der F1-Generation verwendet.

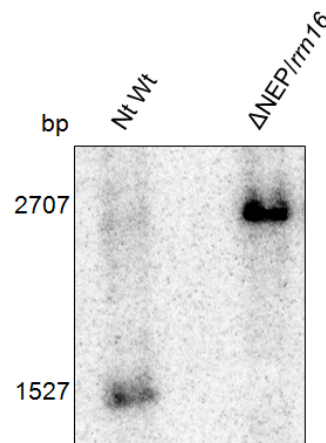


Abb. 12: *Southern Blot* Analyse zum Testen der Homoplastomie der transplastomischen Linie Δ NEP/*rrn16*. 10 μ g Gesamt-DNA der Mutante (P-Generation) und des Wildtyps (Nt Wt) wurde nach Verdau mit *SacII* im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembranen transferiert. Die Hybridisierung der Membran erfolgte mit einer *rrn16*-spezifischen DNA-Sonde (Position s. Abb. 7). Die Größen der zu erwartenden Banden sind gekennzeichnet.

Obwohl die *Southern Blot*-Hybridisierungen darauf hindeuteten, dass die transplastomischen Pflanzen homoplastomisch waren, konnte dieses Ergebnis durch Keimungstests und Kreuzungsversuche nicht vollständig bestätigt werden. Die Samen der F2-Generation der Linien PEP/*accD* TL2, Δ NEP/*accD* TL2 und TL21, PEP/*rpoB* TL1 und TL2 sowie der F1-Generation von Δ NEP/*rrn16* wurden auf Spectinomycin-haltigem Medium gesät. Lediglich für PEP/*accD* wurden unter ca. 1000 kultivierten Keimlingen ausschließlich grüne gefunden. Bei allen anderen transplastomischen Linien segregierten die Nachkommen in grüne, weiße und grün-weiß gescheckte Keimlinge (nicht gezeigt). Dabei wurden unter 500 bis 1000 kultivierten Keimlingen für Δ NEP/*accD* TL2, PEP/*rpoB* TL1 und TL2 bis zu 10 % gebleichte Keimlinge beobachtet, für Δ NEP/*accD* TL21 bis zu 20 % und für Δ NEP/*rrn16* bis zu 25 %

hellgrüne Keimlinge. Dies zeigte, dass bis auf PEP/*accD* TL2 die transplastomischen Linien nicht homoplastomisch waren. Allerdings verdeutlichten die Keimungstests auch, dass der Großteil der Keimlinge einer Aussaat ausschließlich bzw. hauptsächlich Transplastome enthielt und die Pflanzen somit für Versuche verwendet werden konnten. Aus Zeitgründen war es nicht möglich, die transplastomischen Linien erneut mehreren Regenerationsrunden auf RMOP-Medium zu unterziehen, um gegebenenfalls doch homoplastomische Pflanzen zu erhalten. Des Weiteren war es fraglich, ob dies für die betreffenden Linien überhaupt möglich ist. Es ist bekannt, dass ein Ausschalten von *accD* letal ist (Kode *et al.*, 2005), weshalb für Δ NEP/*accD* durchaus zu erwarten ist, dass für das Überleben der Pflanze stets einige Wildtyp-Kopien erhalten werden. Für PEP/*rpoB* wiederum ist es denkbar, dass der relativ schwache *PatpB*-255 PEP-Promotor insbesondere in frühen Stadien der Chloroplastenentwicklung den ursprünglichen NEP-Promotor nicht hinreichend ersetzen kann und daher auch unter Selektionsdruck Wildtyp-Plastome erhalten bleiben.

Da Plastiden maternal vererbt werden (Übersichten in Bock, 2007; Kuroiwa, 2010; Zhang und Sodmergen, 2010), kann durch reziproke Kreuzungen der transplastomischen Pflanzen mit dem Wildtyp der Segregationsstatus ebenfalls untersucht werden.

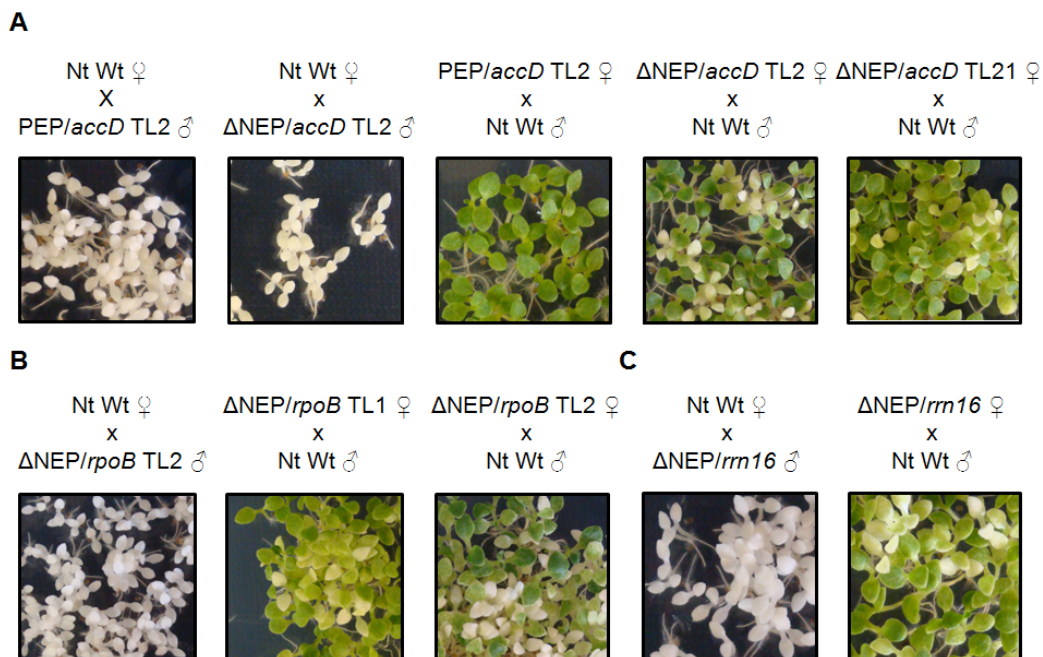


Abb. 13: Phänotyp der Nachkommen nach reziproker Kreuzung der transplastomischen Pflanzen mit dem Tabak-Wildtyp (Nt Wt). Für die Kreuzung wurde die F2-Generation der Mutanten genutzt. Die erhaltenen Samen wurden auf Spectinomycin-haltigem MS-Medium angezogen. 7 Tage nach Aussaat wurden Fotos gemacht. ♀ = Mutter, ♂ = Vater. **A** Kreuzungen für die Linien PEP/*accD* TL2 und Δ NEP/*accD* TL2 und TL21. **B** Kreuzungen für die Linien PEP/*rpoB* TL1 und TL2. **C** Kreuzungen für die Linie Δ NEP/*rm16*.

Abbildung 13 zeigt die Aussaat der nach Kreuzungen erhaltenen Samen auf Spectinomycin-haltigem Medium. Es war zu erkennen, dass außer bei PEP/*accD* TL2 die Nachkommen in grüne und gebleichte Keimlinge segregierten. Die Rückkreuzungen der transplastomischen Linien der F1- und F2-Generation mit dem Tabak Wildtyp bestätigten die Homoplastomie von PEP/*accD* TL2 und die Heteroplastomie von Δ NEP/*accD* TL2 und TL21, PEP/*rpoB* TL1 und TL2 sowie Δ NEP/*rrn16*.

Die Nachkommen der Kreuzungen aus transplastomischer Linie als mütterlichen Elter und dem Wildtyp als väterlichen Elter wurden zusätzlich mittels PCR und *Southern Blot* getestet (nicht gezeigt). Hierfür wurden für die PEP/*accD* TL2 drei grüne Keimlinge und für Δ NEP/*accD* TL2 und TL21, PEP/*rpoB* TL1 und TL2 sowie Δ NEP/*rrn16* je drei grüne und drei gebleichte Keimlinge für die DNA-Präparation eingesetzt. Anschließend wurden einerseits PCRs mit den *aadA*-spezifischen Oligonukleotiden und den genspezifischen Vorwärts- und Rückwärts-*primern* durchgeführt, und andererseits wurde die genomische DNA für den *Southern Blot* verdaut (mit *PsiI* für *accD*, *SmaI/XbaI* für *rpoB* und *SacII* für *rrn16*). Die gebleichten Keimlinge zeigten jeweils die wildtypischen Banden und teilweise eine leichte, dem Transplastom entsprechende Bande. Die grünen Keimlinge zeigten jeweils eine deutliche Mutanten-typische Bande und eine schwache Wildtyp-Bande. Lediglich die grünen Nachkömmlinge von PEP/*accD* TL2 ergaben in der PCR und im *Southern Blot* nur die erwartete, transplastomische Bande.

Obwohl bis auf PEP/*accD* TL2 alle transplastomischen Linien heteroplastomisch waren, konnten Effekte der Promotoraustausche untersucht werden, da aufgrund der sehr schwachen Wildtyp-Signale in den *Southern Blot* Analysen und des geringen Anteils gebleichter Keimlinge in den Keimungstests davon auszugehen war, dass der Großteil der plastidären DNA von den jeweiligen Transplastomen repräsentiert wurde.

3.1.3 Makroskopischer Phänotyp der transplastomischen Pflanzen

Um die phänotypischen Auswirkungen der Promotorveränderungen zu untersuchen, wurden die transplastomischen Linien und zum Vergleich der Wildtyp auf MS-Medium angezogen. Nach 14 d wurden die Keimlinge auf Erde umgesetzt. Abbildung 14A zeigt den Phänotyp der *accD*-Mutanten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung. Während der Keimung waren keine signifikanten Unterschiede der transplastomischen Linien zum Wildtyp zu erkennen. Der Phänotyp der Mutante PEP/*accD* TL2, in der die Transkription von *accD* von einem PEP-Promotor aus erfolgte, glich während der gesamten Entwicklung der Pflanze dem Wildtyp-Phänotyp. Für die Linien Δ NEP/*accD* TL2 und TL21, in denen das NEP-

Promotormotiv verändert war, zeigte sich nach voller Entfaltung der Cotyledonen, dass die Entwicklung der Keimlinge leicht verzögert war im Vergleich zum Wildtyp. 7 d nach Aussaat waren die Keimlinge ca. halb so groß wie die Wildtyp-Keimlinge. Auch nach 10 d war dieser Unterschied noch erkennbar. Etwa nach 14 d erreichten die transplastomischen Pflanzen die Wildtyp-Größe und in der folgenden Entwicklung war kein Unterschied mehr erkennbar. Die Transkription des Gens *accD* durch PEP anstelle von NEP führte demnach zu keiner Veränderung des makroskopischen Phänotyps, während das Ausschalten bzw. Abschwächen des NEP-Promotors die Entwicklung der Pflanze in den ersten Tagen der Chloroplastendifferenzierung verzögerte.

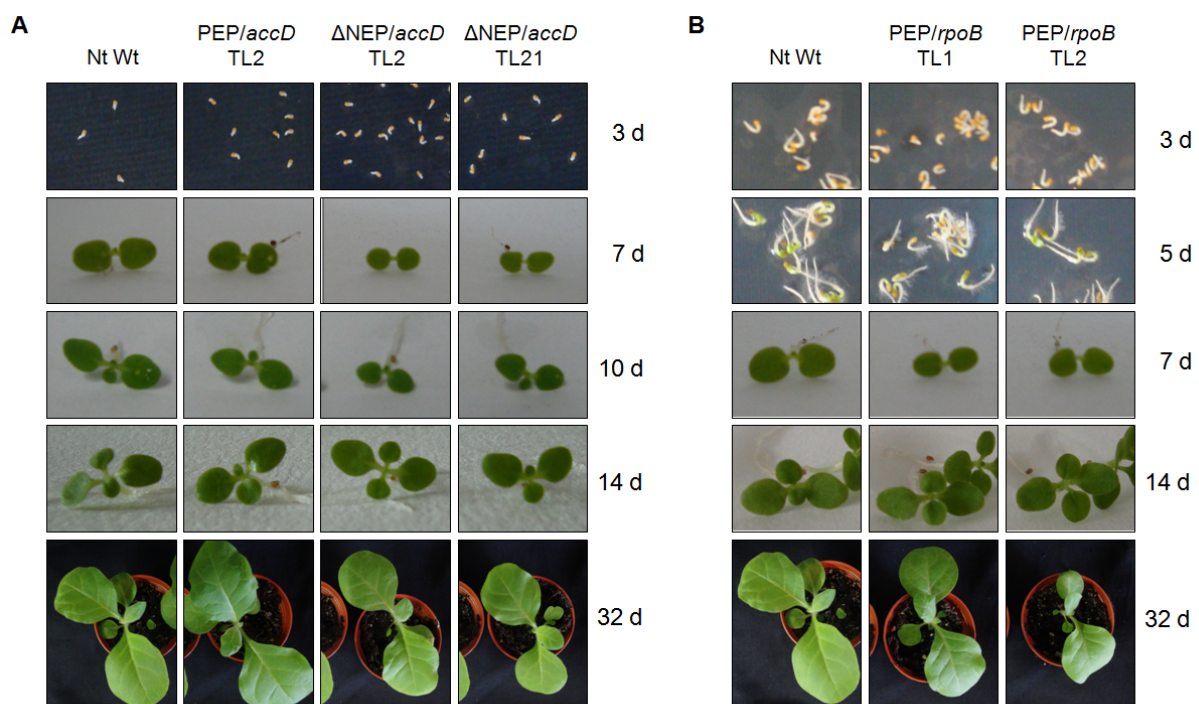


Abb. 14: Makroskopischer Phänotyp der transplastomischen Linien PEP/*accD* TL2, Δ NEP/*accD* TL2 und TL21, PEP/*rpoB* TL1 und TL2. Die Samen der F2-Generation der transplastomischen Pflanzen und Samen des Wildtyps (Nt Wt) wurden auf MS-Medium ausgesät, nach 14 d auf Erde übertragen und unter Standardbedingungen angezogen. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aussaat (d = Tage) wurde das Wachstum der Pflanzen verglichen und dokumentiert.

Für die Linien PEP/*rpoB* TL1 und TL2 (Abb. 14B) war schon im Verlauf der Keimung zu erkennen, dass das Wachstum der transplastomischen Linien im Vergleich zum Wildtyp verzögert war. 7 d nach der Aussaat waren die transplastomischen Keimlinge kleiner als die Wildtyp-Keimlinge. Dieser Effekt konnte immer beobachtet werden, war jedoch in verschiedenen Versuchen unterschiedlich stark ausgeprägt. In einigen Versuchen erreichten die transplastomischen Keimlinge nahezu Wildtyp-Größe. Nach 14 d war kein Unterschied

mehr zwischen Wildtyp und PEP/*rpoB* erkennbar. Allerdings benötigten die Mutanten nach dem Umsetzen auf Erde länger um sich an die neuen Bedingungen zu adaptieren, wodurch es wieder kurzzeitig zu einer verzögerten Entwicklung kam, wie nach 32 d bei PEP/*rpoB* TL2 zu sehen ist. Im späteren Verlauf des Wachstums auf Erde war dieser Unterschied nicht weiter zu beobachten (nicht gezeigt). Die Transkription des *rpoB/C1/C2*-Operons durch PEP anstatt NEP verzögerte also die Embryonalentwicklung und Reifung der Chloroplasten. Dies zeigte, dass ein funktionaler NEP-Promotor *PrpoB-345* sowie die Transkription des Operons durch NEP in diesen Entwicklungsstadien eine wichtige Rolle spielt und nicht vollständig durch PEP-abhängige Transkription bzw. die schon im Samen vorhandenen PEP Moleküle (Demarsy *et al.*, 2006) kompensiert werden kann.

Abbildung 15 zeigt den Phänotyp von Δ NEP/*rrn16* im Vergleich zum Wildtyp. Nur in den ersten zwei bis drei Tagen nach der Aussaat war eine leicht verzögerte Keimung der transplastomischen Linie zu erkennen. Die weitere Entwicklung dieser Linie, in welcher die Transkription von *rrn16* ausschließlich vom PEP-Promotor aus erfolgte, zeigte keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp.

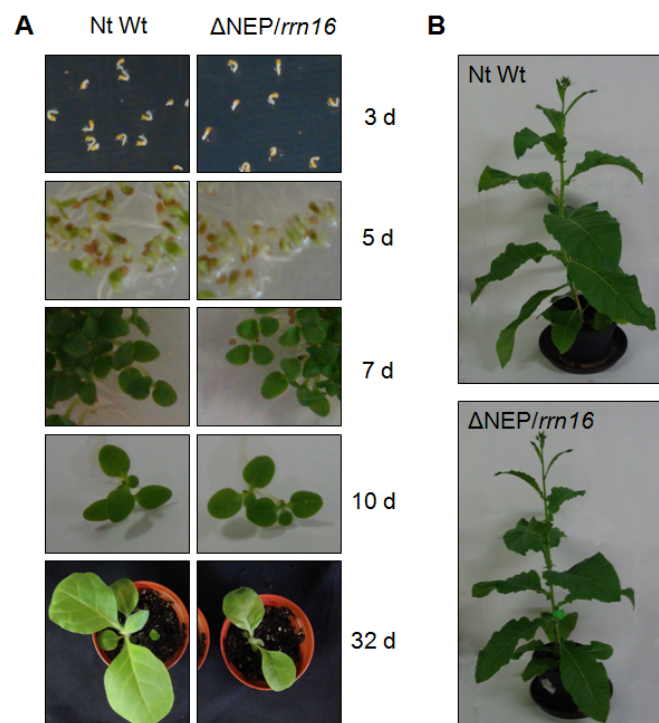


Abb. 15: Makroskopischer Phänotyp der transplastomischen Linie Δ NEP/*rrn16*. Die Samen der F1-Generation und Samen des Wildtyps wurden auf MS-Medium unter Standardbedingungen angezogen und 14 d nach Aussaat auf Erde übertragen. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung wurde das Wachstum der Pflanzen dokumentiert. Nt Wt = Wildtyp. d = Tage nach Aussaat. **A** Entwicklung innerhalb des ersten Monats. **B** Phänotyp der Pflanzen nach 3 Monaten.

Alle transplastomischen Linien wurden zum Vergleich mit dem Wildtyp außerdem auf MS-Medium mit Spectinomycin, mit Streptomycin und direkt auf Erde angezogen. Es wurden dieselben Wachstumseffekte wie auf MS-Medium beobachtet. Außerdem zeigte die Resistenz gegenüber Streptomycin, dass es sich bei den grünen Keimlingen nicht um Pflanzen mit einer spontanen Mutation zu Spectinomycin-Resistenz handelte (Svab *et al.*, 1990a und b; Svab und Maliga, 1993). Auch unter Salz- (300 mM NaCl) und Trockenstress verhielten sich die transplastomischen Linien wie der Wildtyp (nicht gezeigt).

3.1.4 Die veränderte Promotornutzung kann auf RNA-Ebene gezeigt werden

Nachdem gezeigt wurde, dass die erwünschten Promotorveränderungen auf DNA-Ebene erzeugt wurden, wurde untersucht, ob die Ersatz-Promotoren funktional sind und in der Pflanze genutzt werden bzw. ob die Veränderung von Promotormotiven tatsächlich zu einem Ausschalten bzw. Abschwächen des Promotors führt. Des Weiteren sollte gezeigt werden, ob Unterschiede in der Intensität der Promotornutzung im Vergleich zum Wildtyp existieren. Hierfür wurde die *primer extension* Analyse (s. 2.2.9.17) verwendet und zusammen mit einer Sequenz (s. 2.2.9.18) in einem Sequenzgel analysiert, da mit dieser Methode native 5'-Enden von Transkripten detektiert und dadurch Promotoren lokalisiert werden können. Die Abbildungen 16 und 17 zeigen die *primer extension* Analysen für die transplastomischen Linien PEP/*accD* TL2, Δ NEP/*accD* TL2 und TL21 sowie PEP/*rpoB* TL1 und TL2 zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Chloroplastendifferenzierung. Die transplastomischen Pflanzen sowie der Wt wurden auf Erde angezogen und Proben für die RNA-Extraktion (s. 2.2.9.7) wurden für die unterschiedlichen Zeitpunkte der Entwicklung jeweils zur selben Tageszeit genommen. Für die *primer extension* Reaktion wurden 10 μ g (*accD*-Mutanten) bzw. 15 μ g (*rpoB*-Mutanten) Gesamt-RNA eingesetzt.

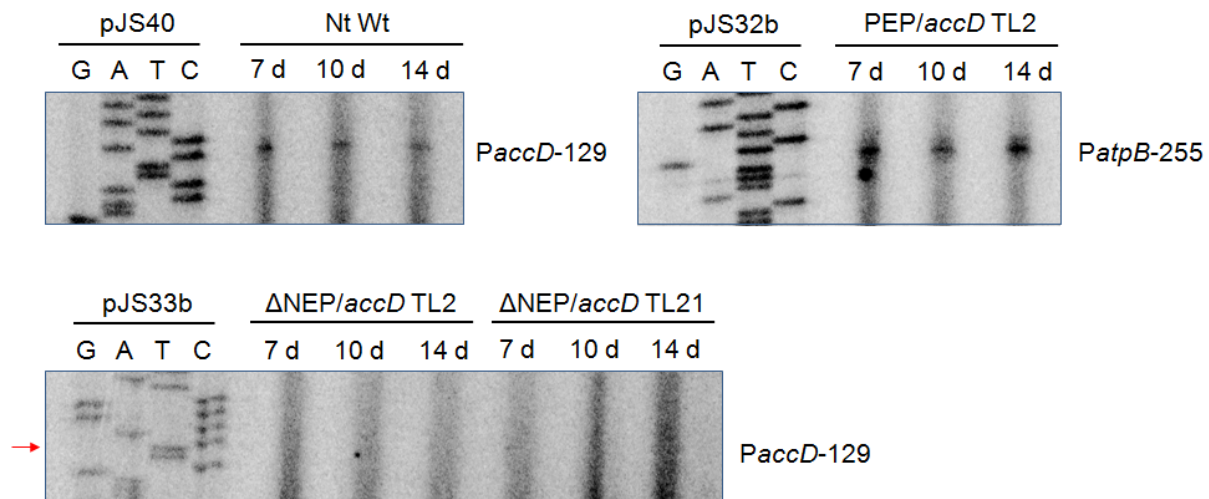


Abb. 16: *Primer extension* Analysen für die transplastomischen Linien PEP/*accD* TL2, ΔNEP/*accD* TL2 und TL21. 10 µg RNA der unter Standardbedingungen auf Erde angezogenen transplastomischen Linien und des Wildtyps (Nt Wt) wurden für die Reaktion eingesetzt. Parallel wurden mit den korrespondierenden Plasmiden (ursprüngliche Transformationsplasmide pJS40, pJS32b und pJS33b; s. 2.1.4, Tab. 2) Sequenzreaktionen durchgeführt und zur Lokalisation von Transkriptionsstartpunkten im Sequenzgel mit aufgetrennt. Der jeweils durch das Signal repräsentierte Promotor ist gekennzeichnet. Der rote Pfeil kennzeichnet das Startnukleotid von *accD* bei Transkription von *PaccD*-129 aus.

Sowohl für den Wildtyp als auch für PEP/*accD* TL2 konnte der jeweils zu erwartende Transkriptionsstart detektiert werden (Abb. 16). Obwohl dieselben RNA-Mengen eingesetzt wurden, waren die Signale für den PEP-Promotor *PatpB*-255, welcher den ursprünglichen NEP-Promotor *PaccD*-129 ersetzte, etwas stärker, was auf eine leicht stärkere Promotornutzung hindeutete. Das Expressionsmuster des Wildtyps, in welchem die Promotornutzung 7 d nach Aussaat am stärksten war und anschließend langsam abnahm, unterschied sich leicht vom Muster in PEP/*accD*. Die *accD*-Expression in der Mutante war nach 14 d etwa genauso stark wie 7 d nach Aussaat. Die *primer extension* Analysen zeigten außerdem, dass der NEP-Promotor *PatpB*-289 tatsächlich ausgeschaltet war (nicht gezeigt). Für ΔNEP/*accD* konnte gemäß den Erwartungen kein Signal auf Höhe des ursprünglichen Transkriptionsstarts für *PaccD*-129 (indiziert durch roten Pfeil) detektiert werden. Die Veränderung des Promotormotivs von TATA zu GCGC führte demnach zu einem Ausschalten des Promotors. Transkripte, die auf die geringe Anzahl vorhandener Wildtyp-Plastome zurückgingen, konnten offenbar nicht detektiert werden. Dies zeigte erneut, dass trotz Heteroplastomie die Transplastome dominieren. Das Fehlen von Signalen für ΔNEP/*accD* deutete zunächst darauf hin, dass keine alternativen Promotoren existieren, die das Fehlen des funktionellen *PaccD*-129 kompensieren.

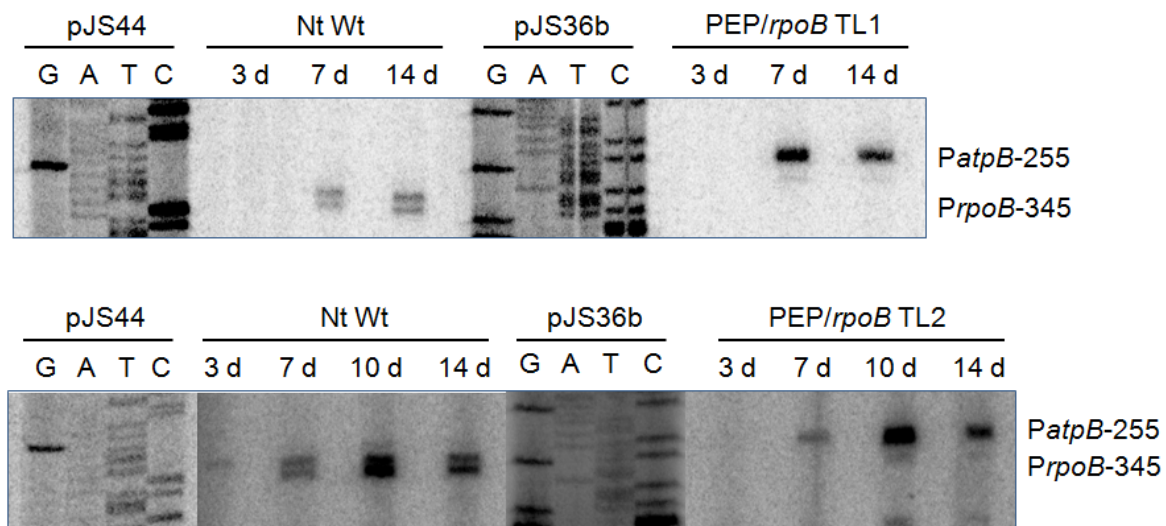


Abb. 17: *Primer extension* Analysen für die transplastomischen Linien PEP/*rpoB* TL1 und TL2. 15 µg RNA der unter Standardbedingungen auf Erde angezogenen transplastomischen Linien und des Wildtyps (Nt Wt) wurden für die Reaktion eingesetzt. Parallel wurden mit den korrespondierenden Plasmiden (ursprüngliche Transformationsplasmide pJS44 und pJS36b; s. 2.1.4, Tab. 2) Sequenzreaktionen durchgeführt und zur Lokalisation von Transkriptionsstartpunkten im Sequenzgel mit aufgetrennt. Der jeweils durch das Signal repräsentierte Promotor ist gekennzeichnet.

Für PEP/*rpoB* TL1 und TL2 und den Wildtyp waren die erwarteten Transkriptionsstartpunkte zu erkennen (s. Abb. 17). Die aus der Nutzung des *atpB*-PEP-Promotors resultierenden Signale der transgenen Linie 1 waren stärker als die NEP-abhängigen Wildtyp-Signale. Ein entsprechender Unterschied war für die transgene Linie 2 nicht zu sehen. Andere *primer extension* Analysen zeigten stärkere Signale für TL2 und dem Wildtyp entsprechende Signale für TL1. Der Promotorersatz führte demnach zu keiner signifikant verstärkten Promotornutzung. Die Transkriptionsmuster von Wildtyp und PEP/*rpoB* unterschieden sich nicht. 3 d nach Aussaat konnte nur ein schwaches (Nt Wt) bzw. kein (Mutante) Signal detektiert werden. Später in der Entwicklung wurden sowohl der NEP- als auch der PEP-Promotor stärker genutzt. Die Expression erreichte ihr Maximum zwischen 7 und 14 d nach der Aussaat, um dann ab 14 d wieder abzunehmen. Auch für diese transplastomischen Linien konnte beobachtet werden, dass *PatpB*-289 tatsächlich ausgeschaltet war (nicht gezeigt).

Die gezeigten Transkriptionsstarts konnten für die Linien PEP/*accD* TL2, Δ NEP/*accD* TL2 und TL21 sowie PEP/*rpoB* TL1 und TL2 auch durch 5'-RACE (s. 2.2.9.20) Versuche bestätigt werden. Außerdem zeigten diese Versuche, da die erhaltenen PCR-Produkte bei dieser Methode sequenziert wurden, dass die erwünschten Veränderungen in den Mutanten tatsächlich auch auf RNA-Ebene vorhanden waren, und dass es sich bei den in der *primer extension* Analyse ermittelten Promotoren um die Ersatzpromotoren bzw. veränderten Promotoren handelte. 100 % der sequenzierten Klone für die transplastomischen Linien

zeigten die zu erwartenden Mutanten-Sequenzen, obwohl bis auf PEP/*accD* alle Pflanzen heteroplastomisch waren. Jedoch wurden aus Zeitgründen pro transplastomischer Linie nur zwei 5'-RACE Analysen mit jeweils 10-20 sequenzierten Klonen pro PCR-Fragment durchgeführt. Für eine statistische Auswertung müssen diese Versuche wiederholt werden.

Es ist bekannt, dass der *psbA*-Promotor (*PpsbA*-85), von welchem aus die *aadA*-Kassette transkribiert wird, divergent funktionieren kann (Sriraman *et al.*, 1998a). Daher sollte durch *primer extension* Analysen für die verschiedenen transplastomischen Linien überprüft werden, ob tatsächlich an entsprechender Stelle innerhalb der Kassettensequenz Transkripte initiiert werden, die fälschlicherweise als echte *accD*- bzw. *rpoB*-Transkripte detektiert werden könnten. Mit den ursprünglich genutzten Oligonukleotiden wurden keine Transkripte detektiert, die an *PpsbA*-85 in die entgegengesetzte Richtung oder auch an bisher unbekannten Promotoren stromaufwärts außerhalb der Kassette initiiert wurden. Außerdem wurden alternative *primer* verwendet, welche weiter stromaufwärts als die ursprünglichen Oligonukleotide hybridisierten. Dabei handelte es sich um Oligonukleotide, die stromabwärts der jeweils genutzten *accD*- bzw. *rpoB*-Promotoren oder zwischen Kassette und Promotor oder innerhalb der Kassette hybridisierten. Auch mit diesen *primern* wurden keine zusätzlichen Transkriptionsstartstellen gefunden. Alle nachfolgend erfassten Transkriptlevel gingen also auf die bekannten Promotoren zurück, oder auf unbekannte Promotoren, die bisher nicht detektiert bzw. lokalisiert werden konnten. Dies war insbesondere für Δ NEP/*accD* interessant, da ein vollständiger *knock out* von *accD* letal ist (Kode *et al.*, 2005). Die Existenz dieser transplastomischen Linie kann zum einen auf die verbliebenen Wildtypplastome zurückgeführt werden, kann jedoch auch ein Hinweis auf alternative *accD*-Promotoren sein, wie die Untersuchung der *steady state* Transkriptlevel in 3.1.5.2 zeigt.

Für die *primer extension* Analyse von Δ NEP/*rrn16* und des Wildtyps wurden die Pflanzen 7 d auf MS-Medium unter Normalbedingungen bzw. im Dunkeln angezogen. Proben für die RNA-Extraktion wurden 7 d nach Aussaat genommen. Zum Vergleich wurde zudem RNA der PEP-defizienten Pflanze Δ *rpoA* (Serino und Maliga, 1998; s. 2.1.4, Tab. 2) präpariert. Für die Reaktion wurden 8-10 μ g Gesamt-RNA eingesetzt (Abb. 18).

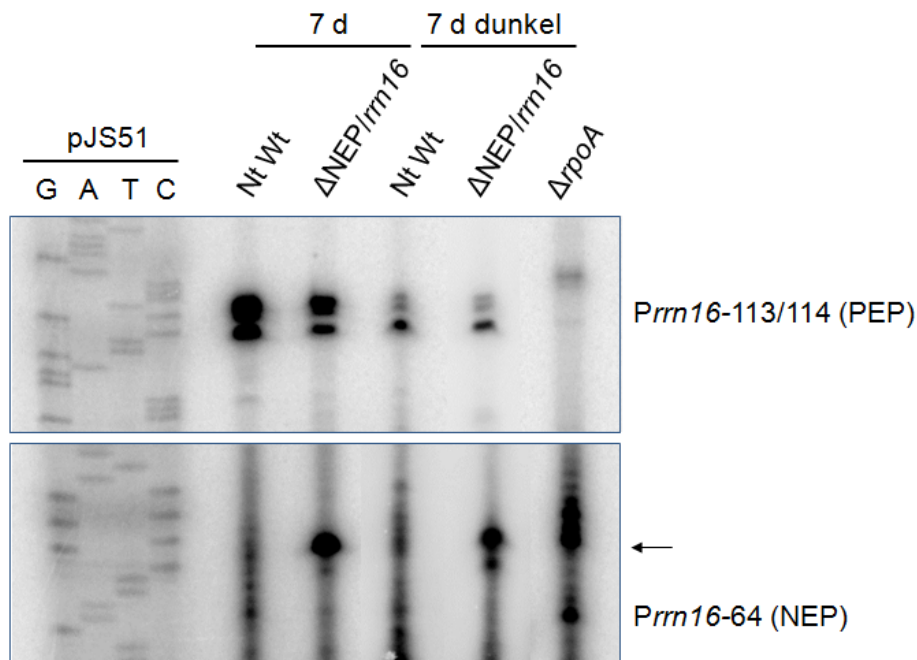


Abb. 18: *Primer extension* Analyse für die transplastomische Linie $\Delta\text{NEP}/rrn16$. 10 μg RNA von 7 d im Dunkeln oder 7 d unter Standardbedingungen auf MS-Medium angezogenen transplastomischen und Wildtyp-Pflanzen (Nt Wt), sowie RNA von $\Delta rpoA$ wurden für die Reaktion eingesetzt. Parallel wurde mit dem korrespondierenden Plasmid (ursprüngliches Transformationsplasmid pJS51; s. 2.1.4, Tab. 2) eine Sequenzreaktion durchgeführt und zur Lokalisation von Transkriptionsstartpunkten im Sequenzgel mit aufgetrennt. Der jeweils durch das Signal repräsentierte Promotor ist gekennzeichnet. Der schwarze Pfeil kennzeichnet ein Signal, welches keinem bisher bekannten Promotor zugeordnet werden kann.

Der PEP-Promotor, der sowohl im Wildtyp als auch in $\Delta\text{NEP}/rrn16$ intakt war, konnte eindeutig detektiert werden. Es wurden drei Banden detektiert. Bei der ursprünglichen Kartierung durch Vera und Sugiura (1995) wurden *primer extension* Produkte an den Positionen -116 und -114 gefunden. Allison *et al.* (1996) detektierten zwei Startnukleotide und benannten den Promotor entsprechend *Prm16-113/114*. Offenbar wurden in diesem Fall alle drei Startstellen detektiert. In $\Delta rpoA$ waren die entsprechenden Banden erwartungsgemäß nicht zu sehen, da PEP hier nicht intakt war. Die Intensität der PEP-Promotornutzung unterschied sich 7 d nach Aussaat und Anzucht unter Normalbedingungen nicht zwischen Wildtyp und $\Delta\text{NEP}/rrn16$. Dies traf auch 3, 10 und 14 d nach Aussaat zu (nicht gezeigt). Bei Anzucht im Dunkeln war die Transkription durch PEP in Wildtyp und Mutante gleichermaßen reduziert. Das Fehlen eines intakten NEP-Promotors und der Transkription durch NEP wurden offenbar nicht durch eine verstärkte PEP-abhängige Transkription kompensiert. Auch in zwei 5'-RACE Experimenten wurde der entsprechende PEP-abhängige Transkriptionsstart in Wildtyp und Mutante gefunden. Des Weiteren konnte dadurch gezeigt werden, dass die erwünschten Sequenzveränderungen in der transplastomischen Linie tatsächlich auch auf RNA-Ebene vorhanden sind. Es wurden keine wildtypischen Sequenzen

im Promotorbereich von $\Delta\text{NEP}/rrn16$ identifiziert. Der NEP-Promotor wurde im Wildtyp erwartungsgemäß deutlich schwächer genutzt als der PEP-Promotor, konnte aber dennoch detektiert werden. In $\Delta rpoA$ war die NEP-Bande entsprechend den Erwartungen stärker. Da PEP nicht aktiv war, musste *rrn16* von NEP transkribiert werden. In $\Delta\text{NEP}/rrn16$ war nur eine sehr schwache bzw. keine Bande auf Höhe des NEP-Promotors zu erkennen (s. Abb. 18). Der NEP-Promotor war also in seiner Funktion eingeschränkt. Die leichte Bande ging wahrscheinlich auf restliche Wildtypplastome zurück. Oberhalb der den NEP-Promotor repräsentierenden Bande war in $\Delta\text{NEP}/rrn16$ eine weitere, kräftige Bande zu erkennen (Pfeil). Dieser Effekt konnte in fünf Wiederholungen reproduziert werden. Die Bande konnte schon in 3 d alten Keimlingen beobachtet werden, erreichte ihre maximale Intensität 7 d nach Aussaat und wurde nach 10 d wieder schwächer (Zeitreihe nicht gezeigt). Auch bei Anzucht im Dunkeln verlor diese Bande an Intensität. Dieser Effekt war in Wiederholungen sogar noch stärker ausgeprägt (nicht gezeigt). Bei $\Delta rpoA$ war interessanterweise eine entsprechende Bande zu erkennen. Dieses Signal könnte sowohl einen bisher unbekannten Promotor wenige Nukleotide stromaufwärts des NEP-Promotors repräsentieren, dessen Transkripte in der Mutante im GC-haltigen Bereich des durch Mutagenese veränderten NEP-Promotormotivs initiiert werden, als auch eine Prozessierungsstelle darstellen. Um zu überprüfen, ob es sich bei dieser Bande um ein Prozessierungsprodukt handelt, wurden die verschiedenen RNA-Präparationen vor dem Einsatz für die *primer extension* Analyse mit Terminator™ 5'-Phosphate-Dependent Exonuclease (Epicentre), welche spezifisch RNA mit 5'-Monophosphat abbaut, entsprechend den Herstellerangaben verdaut. Aus Zeitgründen konnte dieser Versuch nur zweimal durchgeführt werden. Beide Male funktionierte der Verdau offenbar nicht, was dadurch deutlich wurde, dass beim Bandenmuster keine Veränderung sichtbar war und trotz des Verdaus die prozessierte 16S rRNA detektiert wurde (nicht gezeigt). Andererseits könnte dies auch darauf hindeuten, dass das in der Mutante detektierte Signal tatsächlich ein Primärtranskript und somit einen alternativen Promotor repräsentierte. Zwar waren in allen Spuren auch die bekannten, sehr kräftigen Banden der prozessierten 16S rRNA noch zu sehen, jedoch waren diese Banden stets so kräftig, dass die eingesetzte Enzymmenge möglicherweise nicht ausreichte, um sämtliche prozessierte RNA zu verdauen. Es sind also weitere Versuche nötig, um die Herkunft dieses Signals eindeutig zu klären.

3.1.5 Analyse des primären Transkriptoms der Tabakmutanten

Das primäre Transkriptom der 7 d alten transplastomischen Pflanzen wurde mittels dRNA-Seq untersucht (s. 2.2.9.22) und potentielle Transkriptionsstartstellen (TSS) analysiert sowie mit den Daten der *primer extension* Analysen verglichen. Zur Auswertung der Daten und Klassifizierung wurde der Integrated Genome Browser von Affymetrix (Nicol *et al.*, 2009; s. 2.2.9.22) verwendet. Die erhaltenen *reads* der cDNA-Fragmente wurden sowohl gegen die veränderten Sequenzen der untersuchten Promotor- und Genbereiche kartiert, als auch zum Vergleich mit dem Wildtyp gegen das Tabakplastom.

3.1.5.1 Aktivierung zusätzlicher Promotoren in PEP/*accD* und Δ NEP/*accD*

In Abbildung 19A ist die relative Anzahl kartierter *reads* für die Promotorregion und den Bereich stromaufwärts der *aadA*-Kassette der *accD*-Mutanten im Vergleich zum primären Transkriptom des Wildtyps dargestellt. In PEP/*accD* war die erwartete TSS für *PatpB*-255, welcher *PaccD*-129 ersetzte, nicht erkennbar. Möglicherweise wurde der *atpB*-Promotor stromaufwärts von *accD* nur schwach genutzt, sodass keine Anreicherung der primären Transkripte detektiert werden konnte. In den *primer extension* Analysen konnte die Nutzung des PEP-Promotors anstelle des NEP-Promotors stets nachgewiesen werden. Allerdings schienen weiter stromaufwärts von *PatpB*-255 (knapp stromabwärts der Kassette) Transkripte initiiert zu werden. Jedoch waren die entsprechenden *reads* der +TEX-Probe nicht signifikant angereichert gegenüber der -TEX-Probe, und es konnte kein potentielles Promotormotiv stromaufwärts dieser Stelle gefunden werden. Somit scheint es sich hierbei nicht um eine primäre TSS zu handeln. In Δ NEP/*accD* wurde der veränderte Promotor offenbar nicht genutzt. Dies stimmte mit den *primer extension* Analysen überein. Allerdings war eine TSS mit schwach angereicherten *reads* an der Position -158 relativ zum Translationsstart zu erkennen, die auch im Wildtyp detektiert werden konnte. Tatsächlich konnte an entsprechender Stelle auch in den *primer extension* Analysen ein sehr schwaches Signal im Wildtyp und Δ NEP/*accD* beobachtet werden (s. Abb. 19B). Diese neue TSS wurde auch in anderen Wildtyp-Präparationen gefunden (Dr. Petya Zhelyazkova, pers. Mitteilung). Daher scheint es sich hierbei um einen alternativen *accD*-Promotor zu handeln. Die Suche nach möglichen Promotormotiven ergab zum Einen zwei potentielle NEP-Motive (s. Abb. 20). Zum anderen konnten zwei potentielle -10-Regionen und schwach konservierte -35-Motive gefunden werden. Warum der bekannte Promotor an Position -129 im Gegensatz zu den *primer extension* Analysen nicht zu erkennen war, ist unklar. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Prozessierungsstelle in den Mutanten sich nicht von der wildtypischen unterscheidet, und

bei gleicher Skalierung der Mutanten- und Wildtyp-Graphen (nicht gezeigt) auch die Menge angereicherter *reads* über den entsprechenden Bereich annähernd gleich war.

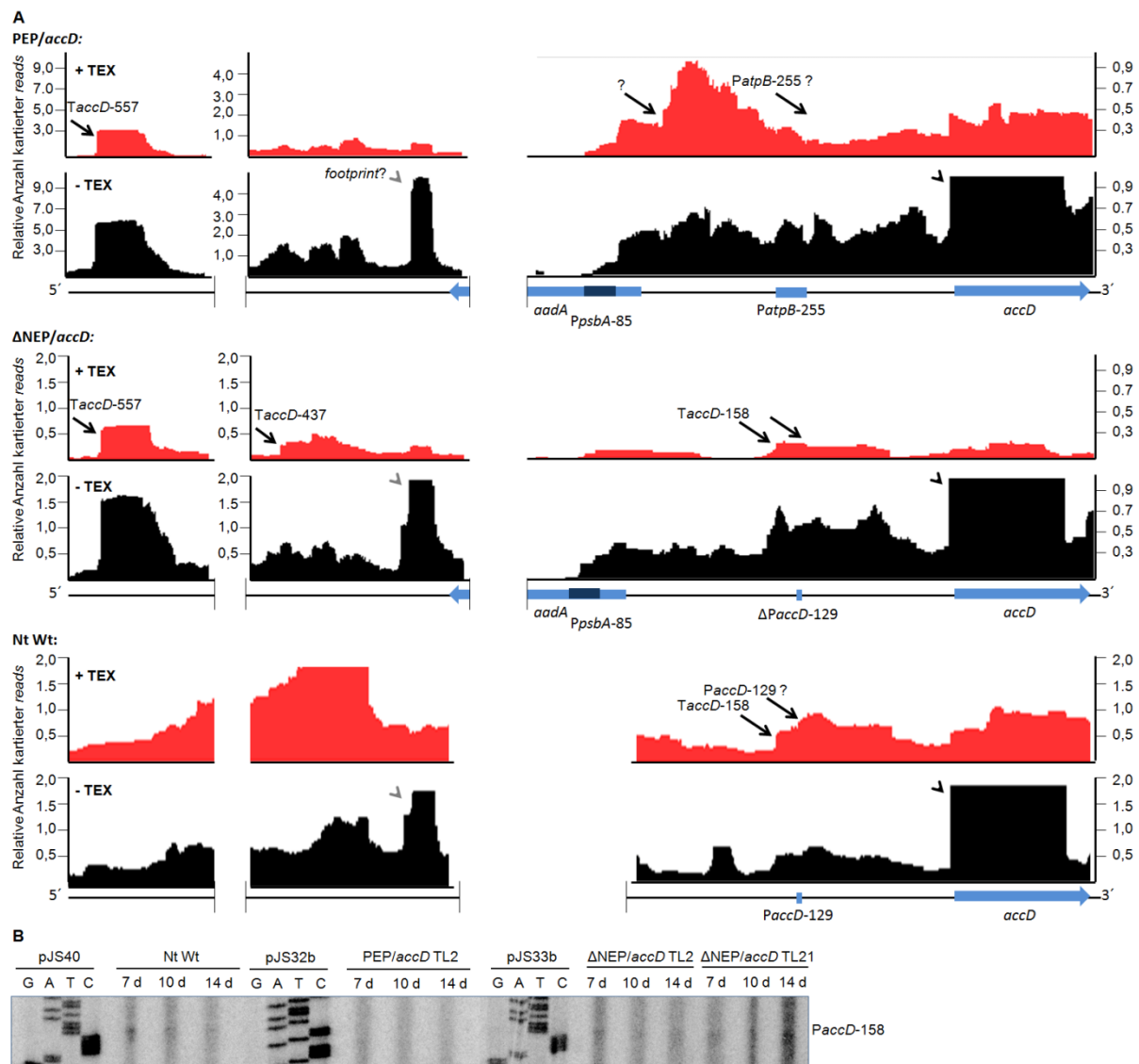


Abb. 19: Transkriptionsstartstellen in PEP/*accD* TL2, ΔNEP/*accD* TL2 und Wildtyp. **A** Darstellung der dRNA-Seq-Ergebnisse. Die cDNA *reads* der cDNA-Bibliotheken, die mit primären Transkripten angereichert (+TEX, rot) bzw. nicht angereichert (-TEX, schwarz) waren, wurden gegen die veränderten *accD*-Sequenzen bzw. das Tabakplastom kartiert. Die Graphen wurden normalisiert gegen die Gesamtzahl der kartierten Chloroplasten-*reads*, und die relative Anzahl kartierter *reads* pro Gen- bzw. Genomposition wurde aufgetragen (s. 2.2.9.22). Unterhalb der Graphen sind die korrespondierenden Gen- bzw. Genomabschnitte dargestellt. Schwarze Pfeile kennzeichnen potentielle TSS. Schwarze Pfeilspitzen kennzeichnen Prozessierungsstellen, die graue Pfeilspitze markiert eine potentielle Bindestelle für ein RNA-bindendes Protein. T = potentieller Promotor, der noch verifiziert werden muss. **B** *Primer extension* Analyse der Promotorregion von *accD* in den Mutanten und dem Wildtyp. Dargestellt ist ein schwaches Signal, welches bislang als Hintergrund charakterisiert wurde.

Stromaufwärts der Kassette wurden offenbar eine (PEP/*accD*) bzw. zwei (ΔNEP/*accD*) weitere TSSs in den Mutanten aktiviert. Beiden Mutanten war *TaccD-557* gemein, welche im Wildtyp nicht genutzt wurde. Der Sequenzbereich um die Nukleotide -50 bis -1 relativ zur

TSS enthält ein potentiell PEP-Promotormotiv (s. Abb. 20). In Δ NEP/*accD* wurde zusätzlich eine TSS an Position -437 relativ zum Translationsstart aktiviert. Die stromaufwärts gelegene Sequenz enthält sowohl ein potentiell NEP- als auch PEP-Motiv (s. Abb. 20). In den Mutanten wie auch im Wildtyp wurde ein kurzes Signal stromaufwärts des Kassetteninsertionsorts beobachtet, welches in den -TEX-Proben angereichert war. Hierbei handelt es sich vermutlich um einen *footprint* einer Bindestelle eines RNA-Bindeproteins (Dr. Petya Zhelyazkova, pers. Mitteilung).

TaccD-158:

CCGCCCTTTATTAAAAATTATATTATTTTAAATAATATAAA

CCGCCCTTTATTAAAAATTATATTATTTTAAATTAATATAAA

TaccD-437:

TACGGATCCTTAGGATTGGTATATTCTTTCTATCCTGTAGTTTGTA

TaccD-557:

TATATTTTGACTAAGTATATACTTACCTAGATATACAAGATTGAAATA

TpoB-608:

ATAAAAGAGAAGAAAGACGGATATTATAGATATCTCCACACGTGGTTA

*TaccD*1:

GAGCAATAGCACCTCTTGATAGACAAGAAAATGATT

*TaccD*4:

TTCGAGATGGCGCTCGATGACGCCAACTACCTCTGATAGTTGA

Abb. 20: Potentielle Promotormotive, die im Bereich -50 bis -1 stromaufwärts mittels dRNA-Seq identifizierter TSS in den transplastomischen Linien PEP/*accD* TL2, Δ NEP/*accD* TL2 und PEP/*rpoB* TL2 gefunden wurden. Das jeweilige Startnukleotid ist fett hervorgehoben. Mögliche -10- und -35-Boxen potentieller PEP-Promotoren sind unterstrichen. Potentielle NEP-Promotormotive sind gelb hinterlegt.

Abbildung 21 zeigt die kartierten *reads* innerhalb der Kassettensequenz. Auf dem Minus-Strang war der Transkriptionsstart der Kasette zu erkennen. Die Menge an kartierten *reads* über den gesamten Kassettenbereich verdeutlichte, dass die Kasette in Δ NEP/*accD* schwächer transkribiert wurde als in PEP/*accD*, was möglicherweise auf die Heteroplastomie der ersteren Mutanten zurückzuführen war. Auf dem Plus-Strang stromaufwärts des *PpsbA*-85 war in allen transplastomischen Pflanzen stets ein kurzes, scharfes Signal erkennbar, das nur 17 Nukleotide umfasste, und somit vermutlich keine TSS repräsentierte (s. Abb. 21; PEP/*accD*, +TEX, rechter Graph). Das Signal wenig stromabwärts des Kassettenendes, welches in Δ NEP/*accD* ähnlich einer Prozessierungsstelle in der -TEX-Probe angereichert war (s. Abb. 21; Δ NEP/*accD*, -TEX, linker Graph), war ebenfalls in allen transplastomischen

Linien erkennbar, und repräsentierte vermutlich prozessierte Transkripte, die stromaufwärts der Kassette initiiert wurden.

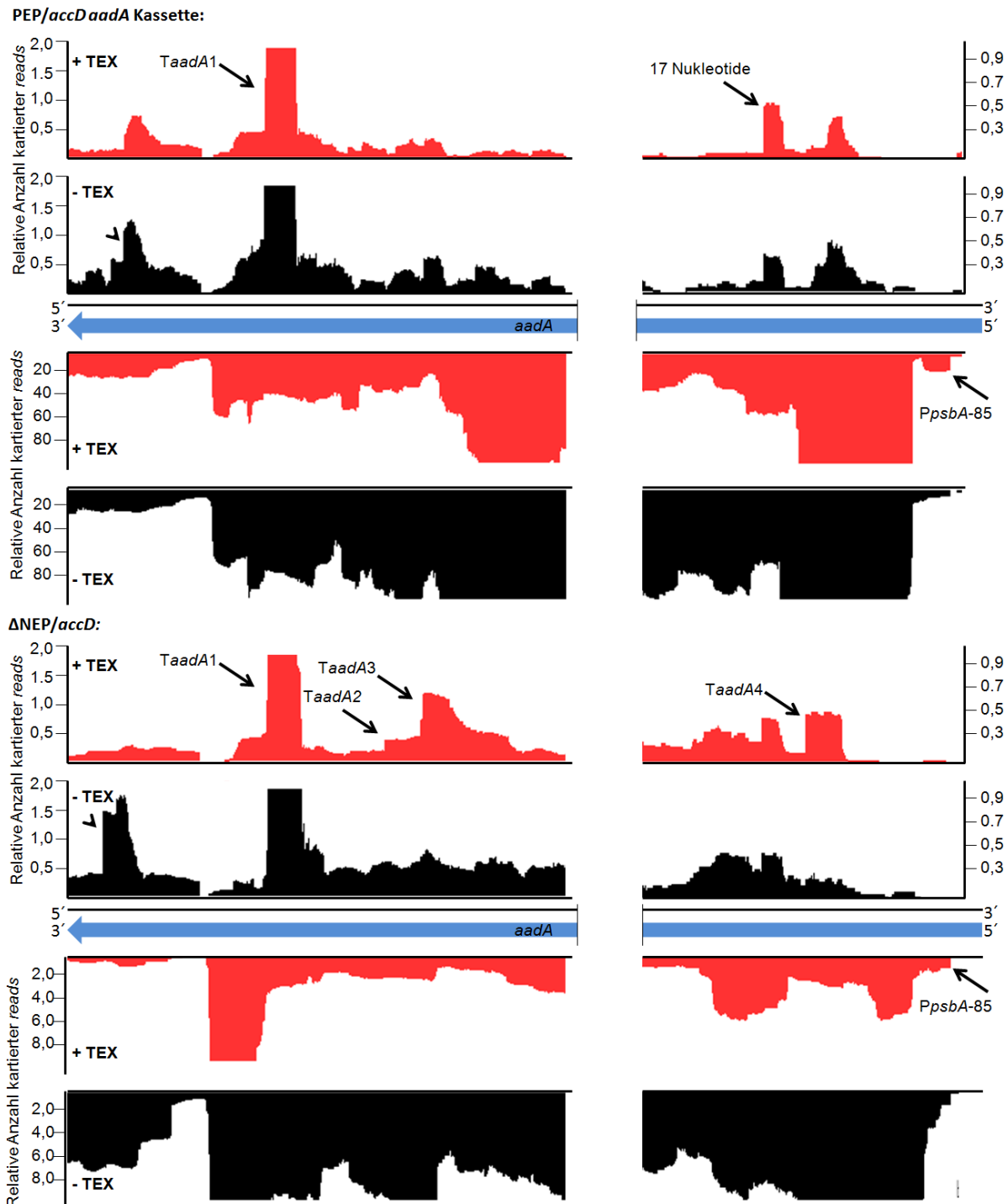


Abb. 21: Darstellung der dRNA-Seq-Ergebnisse für den Sequenzbereich der *aadA*-Kassette für PEP/*accD* TL2 und ΔNEP/*accD* TL2. Die cDNA *reads* der cDNA-Bibliotheken, die mit primären Transkripten angereichert (+TEX, rot) bzw. nicht angereichert (-TEX, schwarz) waren, wurden gegen die Sequenz der *aadA*-Kassette kartiert. Die Graphen wurden normalisiert gegen die Gesamtzahl der kartierten Chloroplasten-*reads*, und die relative Anzahl kartierter *reads* pro Gen- bzw. Genomposition wurde dargestellt (s. 2.2.9.22). Gezeigt sind der Plus- und Minus-Strang der DNA. Unterhalb der Graphen ist die *aadA*-Kassette schematisch dargestellt. Schwarze Pfeile kennzeichnen potentielle TSS. Schwarze Pfeilspitzen kennzeichnen Prozessierungsstellen. T = potentieller Promotor, der noch verifiziert werden muss.

Zudem wurde in allen Mutanten *TaadA1* gefunden (s. Abb. 21). Dieser TSS ist ein Motiv vorgeschaltet (s. Abb. 20), welches theoretisch unter den gegebenen Bedingungen von PEP genutzt werden könnte. In Δ NEP/*accD* wurden drei weitere, mögliche TSSs (*TaadA2*, 3 und 4) innerhalb der Kasette aktiviert. Lediglich in der korrespondierenden Sequenz stromaufwärts von *TaadA4* wurde ein potentielles PEP-Promotormotiv identifiziert (s. Abb. 20).

3.1.5.2 Ein zusätzlicher Promotor stromaufwärts wird in PEP/*rpoB* aktiviert

Die Startstelle des *atpB*-Promotors war in PEP/*rpoB* TL2 deutlich zu erkennen (s. Abb. 22). Die originale Startstelle im Wildtyp (nicht gezeigt) war nur schwach detektierbar. Die Prozessierungsstelle in der Mutante unterschied sich nicht von der wildtypischen. Innerhalb des Kassettenbereichs wurden kaum Transkripte initiiert. Es wurde lediglich - wie in allen transplastomischen Pflanzen - *TaadA1* (s. Abb. 21) gefunden. Im Gegensatz zum Wildtyp (nicht gezeigt) wurde in PEP/*rpoB* ein Promotor an Position -608 relativ zum Translationsstart aktiviert. Zwar sind in der -TEX-Probe mehr *reads* kartiert, dennoch könnte es sich um eine TSS handeln (Dr. Zhelyazkova, pers. Mitteilung), denn im stromaufwärts gelegenen Sequenzbereich konnte ein NEP-Promotormotiv identifiziert werden (s. Abb. 20). Stromaufwärts von *TrpoB*-608 waren zahlreiche Transkripte in der -TEX-Probe zu sehen. Allerdings konnte weiter stromaufwärts keine TSS gefunden werden, die den Ursprung dieser Transkripte klären würde.

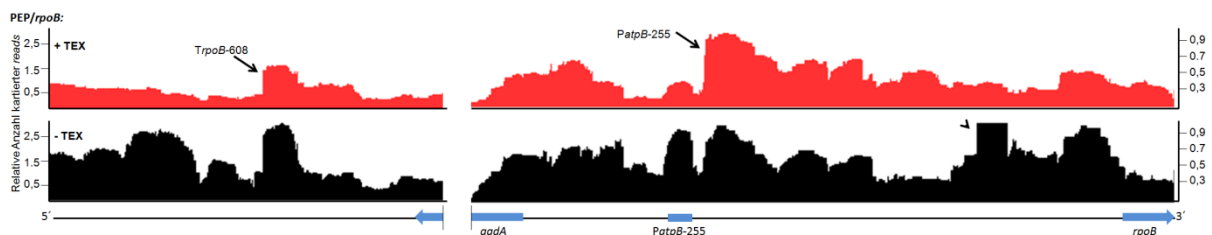


Abb. 22: Darstellung der dRNA-Seq-Ergebnisse für PEP/*rpoB* TL2. Die cDNA *reads* der cDNA-Bibliotheken, die mit primären Transkripten angereichert (+TEX, rot) bzw. nicht angereichert (-TEX, schwarz) waren, wurden gegen die veränderten *rpoB*-Sequenzen bzw. das Tabakplastom kartiert. Die Graphen wurden normalisiert gegen die Gesamtzahl der kartierten Chloroplasten-*reads*, und die relative Anzahl kartierter *reads* pro Gen- bzw. Genomposition wurde aufgetragen. Unterhalb der Graphen sind die korrespondierenden Gen- bzw. Genomabschnitte dargestellt. Schwarze Pfeile kennzeichnen potentielle TSS. Schwarze Pfeilspitzen kennzeichnen Prozessierungsstellen. T = potentieller Promotor, der noch verifiziert werden muss.

3.1.5.3 Keine signifikanten Effekte in Δ NEP/*rrn16*

Im *rrn16*-Promotorbereich in Δ NEP/*rrn16* wurde die mit dem PEP-Promotor korrespondierende Startstelle detektiert und erwartungsgemäß keine TSS für den NEP-Promotor (s. Abb. 23). Wie auch im Wildtyp (nicht gezeigt) waren in der Mutante die

charakteristische Prozessierungsstelle an Position -30 relativ zum 5'-Ende der reifen 16S rRNA (Vera *et al.*, 1993; Vera und Sugiura, 1995), sowie das reife Ende selbst zu erkennen. Innerhalb der *aadA*-Kassette waren auf dem Plus-Strang die in allen transplastomischen Linien detektierten Signale erkennbar (*TaadA1*), sowie zwei der potentiellen TSSs (*TaadA3* und 4), die auch in Δ NEP/*accD* aktiviert worden waren.

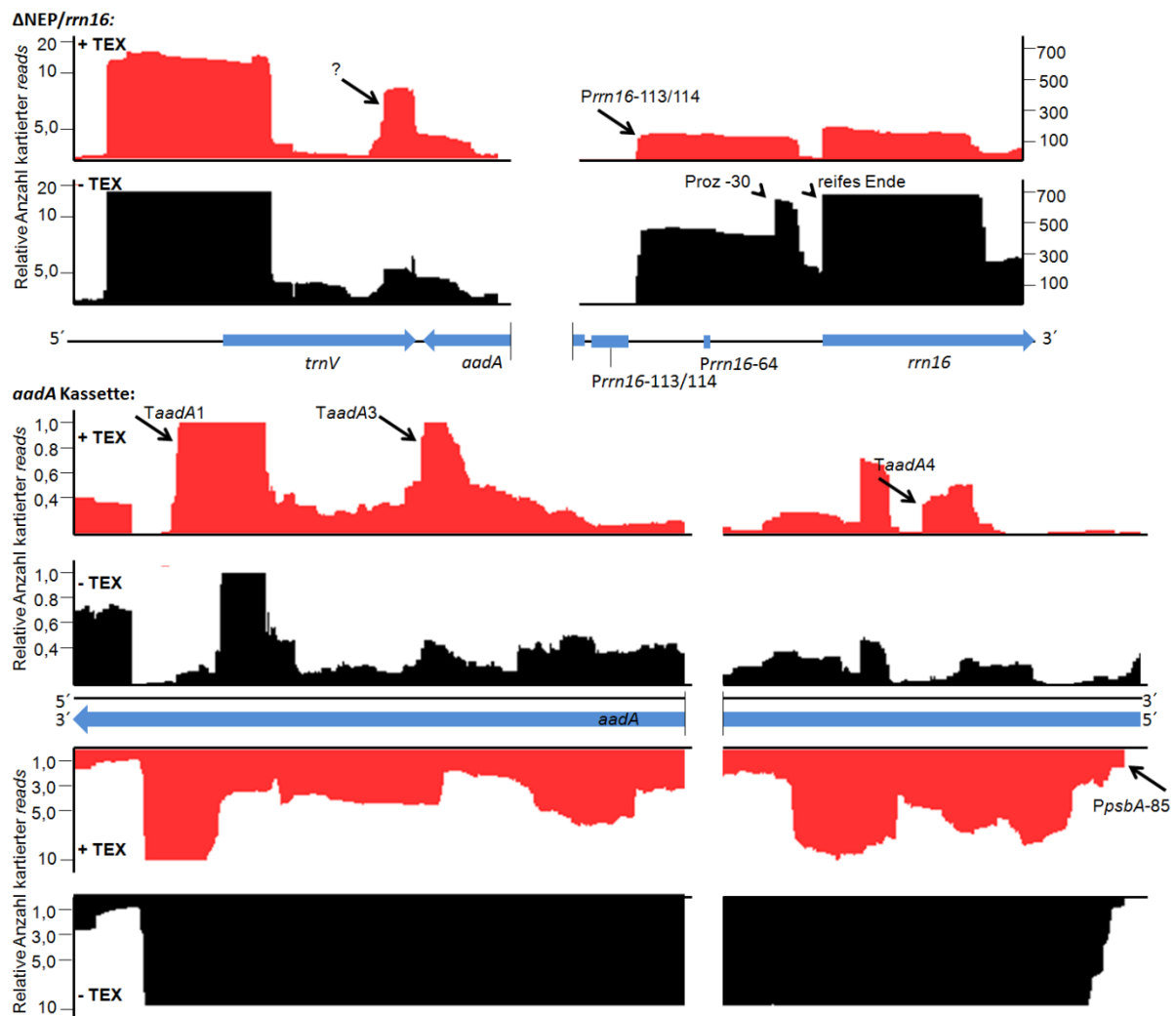


Abb. 23: Darstellung der dRNA-Seq-Ergebnisse für Δ NEP/*rnn16*. Die cDNA *reads* der cDNA-Bibliotheken, die mit primären Transkripten angereichert (+TEX, rot) bzw. nicht angereichert (-TEX, schwarz) waren, wurden gegen die veränderten *rnn16*-Sequenzen bzw. das Tabakplastom kartiert. Die Graphen wurden normalisiert gegen die Gesamtzahl der kartierten Chloroplasten-*reads*, und die relative Anzahl kartierter *reads* pro Gen- bzw. Genomabschnitt wurde aufgetragen. Unterhalb der Graphen sind die korrespondierenden Gen- bzw. Genomabschnitte dargestellt. Schwarze Pfeile kennzeichnen potentielle TSS. Schwarze Pfeilspitzen kennzeichnen Prozessierungsstellen. T = potentieller Promotor, der noch verifiziert werden muss

Stromaufwärts der Kassette wurde der Transkriptionsstart der tRNA-Val beobachtet, sowie ein weiteres Signal, welches innerhalb der *trnV*-Sequenz initiiert wurde und hinsichtlich der signifikant angereicherten Nukleotide exakt mit dem 3'-Ende der tRNA endete. Dies deutete darauf hin, dass es sich hierbei um ein Artefakt resultierend aus tRNA-Resten handelte. Auch

für den Wildtyp wurde ein entsprechendes, etwas schwächeres Signal beobachtet (nicht gezeigt). Somit konnten im Vergleich zum Wildtyp keine signifikanten Effekte auf die primären *rrn16*-Transkripte durch das Ausschalten des *rrn16*-NEP-Promotors beobachtet werden.

3.1.6 Einfluss der veränderten Promotoren auf Transkriptmengen

Nachfolgend sollte analysiert werden, ob das Ausschalten bzw. der Austausch der Promotoren einen Einfluss auf die *steady state* Transkriptmengen hat. Dies sollte Rückschlüsse darauf erlauben, ob PEP zu verschiedenen Zeitpunkten der Chloroplastendifferenzierung die Rolle von NEP bei der Transkription übernehmen und entsprechende RNA-Mengen zur Verfügung stellen kann. Dafür wurden *Northern Blots* und qRT-PCRs durchgeführt.

3.1.6.1 *rrn16* Transkriptmengen sind unverändert in Δ NEP/*rrn16*

Um zu untersuchen, ob der Wegfall des NEP-Promotors einen Einfluss auf die Menge der 16S rRNA hat, wurden 10 μ g RNA vom Wildtyp, der transplastomischen Linie und Δ *rpoA* mittels *Northern Blot* analysiert. Abbildung 24 zeigt die entsprechende Analyse für RNA 10 d alter Pflanzen.

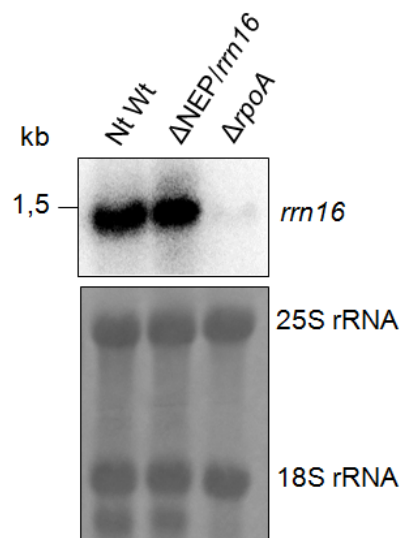


Abb. 24: *Northern Blot* Analyse der transplastomischen Linie Δ NEP/*rrn16*. Die transplastomische Linie sowie der Wildtyp (Nt Wt) wurden unter Standardbedingungen auf Erde angezogen und nach 10 d Proben für die RNA-Präparation genommen. Zum Vergleich wurde auch RNA von Δ *rpoA* untersucht. 10 μ g RNA wurden im 1 %igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit einer *rrn16*-spezifischen Oligonukleotid-Sonde hybridisiert. Zum Abgleich der Transkriptgrößen wurde ein RNA-Marker (RiboRuler™ RNA Ladder High Range, Fermentas) parallel im Gel mit aufgetrennt. Die Position der Markerbande ist gekennzeichnet. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung des Gels wurde die Membran mit Methylblau gefärbt und die Banden der 25S und 18S rRNA dokumentiert.

In $\Delta rpoA$ konnte entsprechend den Erwartungen nur ein sehr schwaches Signal mit der *rrn16*-spezifischen Sonde detektiert werden. Die Transkriptmengen von Wildtyp und $\Delta NEP/rrn16$ glichen sich. Dasselbe Ergebnis wurde auch für 7 und 14 d alte Pflanzen erhalten. Das Ausschalten des NEP-Promotors beeinflusste also nicht den *rrn16*-Transkriptlevel.

3.1.6.2 Die Transkription von *accD* durch PEP führt zur leichten Überexpression

In den *primer extension* Analysen wurde für PEP/*accD* TL2 eine leicht verstärkte Promotornutzung beobachtet, während in $\Delta NEP/accD$ TL2 und TL21 kein Transkript detektiert wurde. Zunächst wurde mittels *Northern Blot* überprüft, ob sich dieses Ergebnis auf die RNA-Level in den transplastomischen Linien auswirkt. In Abbildung 25 ist das Resultat für den *Northern Blot* mit Gesamt-RNA 14 d alter Pflanzen zu sehen.

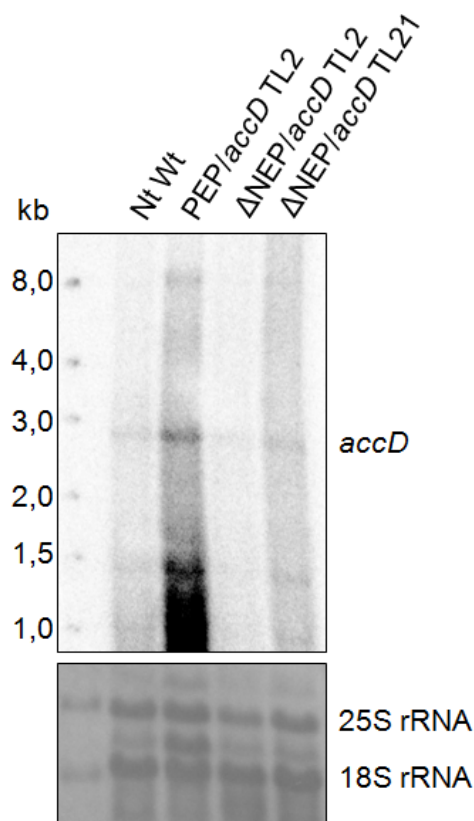


Abb. 25: *Northern Blot* Analyse der transplastomischen Linien PEP/*accD* TL2 und $\Delta NEP/accD$ TL2 und TL21. Die transplastomischen Linien sowie der Wildtyp (Nt Wt) wurden unter Standardbedingungen auf Erde angezogen und 14 d nach Aussaat Proben für die RNA-Präparation genommen. 20 µg RNA wurden im 1 %igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit einer *accD*-spezifischen Einzelstrang-Sonde hybridisiert. Zum Abgleich der Transkriptgrößen wurde ein RNA-Marker (RiboRuler™ RNA Ladder High Range, Fermentas) parallel im Gel mit aufgetrennt. Die Positionen der Markerbanden sind gekennzeichnet. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung des Gels wurde die Membran mit Methylblau gefärbt und die Banden der 25S und 18S rRNA dokumentiert.

Die Bandenmuster der verschiedenen Linien unterschieden sich nicht vom Wildtyp. Multiple Banden bei der Detektion von *accD*-Transkripten sind nicht überraschend und wurden auch

für andere Spezies wie *Arabidopsis* gefunden (Meurer *et al.*, 1996; Ke *et al.*, 2000). Die schwachen Signale bei 8 kb und vermutlich auch die Signale bei 3 kb resultieren aus dem Umstand, dass *accD* als Teil eines Operons gemeinsam mit anderen Genen als polycistronische RNA transkribiert und anschließend prozessiert wird. Die Bande um 1,5 kb entspricht der erwarteten Größe der *accD*-mRNA. Die Intensitäten der Signale in Wildtyp und Mutanten unterschieden sich. Anhand der Bande bei etwa 1,5 kb war zu erkennen, dass die Transkription von *accD* durch PEP statt durch NEP zu einer leichten Überexpression führte. Die verstärkte Promotornutzung (s. 3.1.4, Abb. 16) wurde also in den *steady state* Transkriptmengen widergespiegelt. Dieser Effekt konnte erst ab 10 bis 14 d nach Aussaat beobachtet werden. *Northern Blots* mit RNA 7 d alter Pflanzen (nicht gezeigt) zeigten keine Unterschiede der mRNA-Mengen von Wildtyp und PEP/*accD* TL2. Außerdem war in der PEP/*accD*-Spur unterhalb der 1,5 kb-Bande ein Schmier erkennbar. Dieser resultierte vermutlich entweder aus einem teilweisen Abbau der überexprimierten *accD*-RNA oder repräsentierte Prozessierungsprodukte der übrigen, gemeinsam mit *accD* transkribierten RNAs. Demgegenüber waren die Intensitäten der Banden in Δ NEP/*accD* TL2 und TL21 von vergleichbarer Stärke wie die wildtypischen Banden. Trotz des Ausschaltens des NEP-Promotors wurden also *accD*-Transkripte produziert. Zum Teil gingen diese Transkripte sicherlich auf die wenigen, verbliebenen Wildtyp-Plastome zurück. Jedoch war es unwahrscheinlich, dass diese verglichen mit dem Wildtyp deutlich geringere Menge an wildtypischer DNA zum selben Transkriptlevel führte. Da durch die *primer extension* Analysen weder eine Transkription vom divergenten *psbA*-Promotor, der die Transkription der *aadA*-Kassette steuert, beobachtet werden konnte, noch alternative Promotoren detektiert wurden, war der Ursprung dieser Transkripte zunächst ungeklärt. Die Daten der dRNA-Seq ließen jedoch vermuten, dass zum Einen ein alternativer Promotor an Position -158 existiert, der in der Mutante intakt war, und zum Anderen innerhalb der Kassette und stromaufwärts dieser Transkripte initiiert wurden.

Da die Detektion von *accD* insbesondere in sehr jungen Pflanzen mittels *Northern Blot* schwierig ist und außerdem die erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden sollten, wurden die Transkriptlevel in Wildtyp und transplastomischen Linien auch mittels qRT-PCR (s. 2.2.9.19) untersucht. Dafür wurde RNA von Pflanzen unterschiedlichen Alters extrahiert und eingesetzt (Abb. 26).

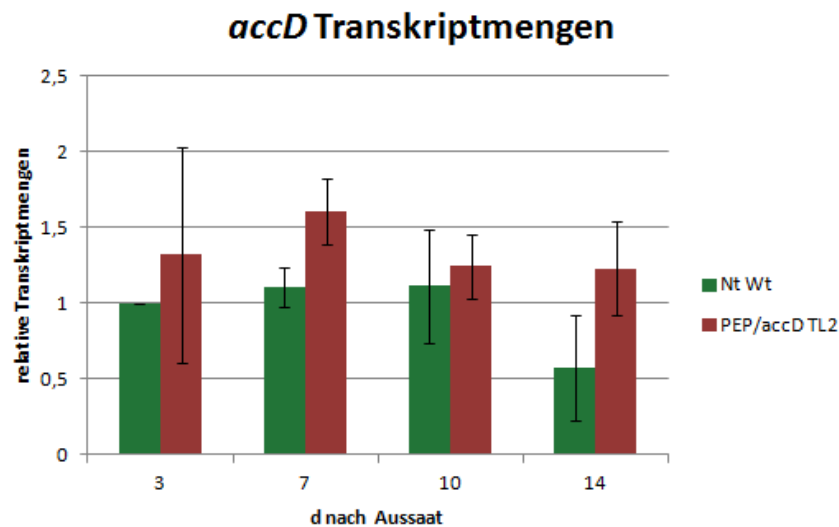
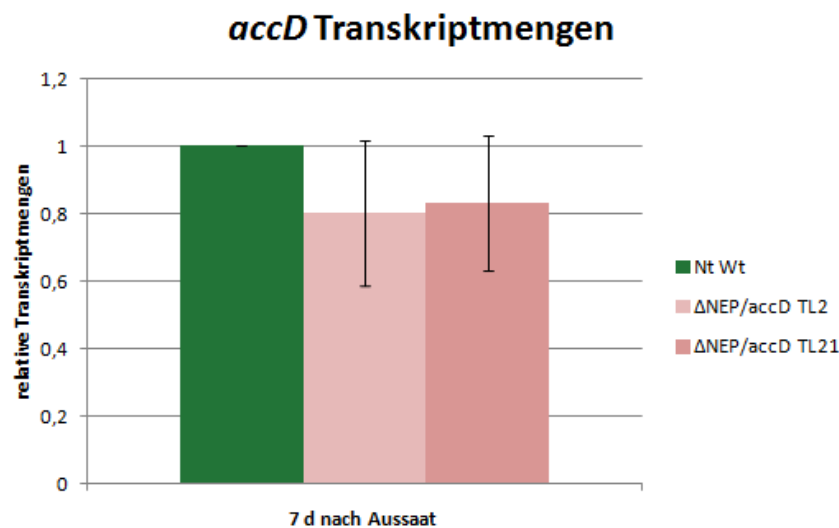
A**B**

Abb. 26: qRT-PCR Analyse der *accD*-Transkriptmengen in den transplastomischen Linien PEP/*accD* TL2 und ΔNEP/*accD* TL2 und TL21. Die transplastomischen Linien und der Wildtyp (Nt Wt) wurden auf Erde unter Standardbedingungen angezogen. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung aber stets zur selben Tageszeit wurden Proben für die RNA-Präparation genommen. Für die Analyse wurden 2 µg RNA eingesetzt. **A** Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Transkriptmengen aus 2 biologischen Replikaten mit je 2 technischen Replikaten für PEP/*accD* TL2 und den Wildtyp. Dabei wurde zur Verrechnung der technischen Replikate der 3 d-Wildtyp-Wert auf 1 normiert. Die Standardabweichungen sind eingezeichnet. **B** Mittelwerte der relativen Transkriptmengen 7 d nach Aussaat aus 2 biologischen Replikaten mit je 2 technischen Replikaten und einem weiteren biologisches Replikat mit einem einzelnen Versuch für ΔNEP/*accD* TL2 und TL21 und den Wildtyp. Der 3 d-Wildtyp-Wert wurde auf 1 normiert. Die Standardabweichungen sind gekennzeichnet.

In Abbildung 26A sind die relativen Transkriptmengen von PEP/*accD* TL2 im Vergleich zum Wildtyp während der Chloroplastendifferenzierung dargestellt. Die Transkriptmuster von Wildtyp und Mutante unterschieden sich kaum. 7 d nach Aussaat war der Transkriptlevel am größten und nahm dann langsam ab. Ein ähnliches Muster wurde bereits in den *primer extension* Analysen für den Wildtyp gezeigt. 3 d nach Aussaat waren die Transkriptlevel

annähernd gleich. Danach waren die Transkriptmengen von PEP/*accD* gegenüber dem Wildtyp leicht erhöht. Im Gegensatz zu den *Northern Blots* konnte dieser Überexpressionseffekt schon 7 d nach Aussaat beobachtet werden. In 21 d alten Keimlingen wurden in Wildtyp und Mutante annähernd gleiche Transkriptmengen detektiert (nicht gezeigt). Die Transkription durch PEP anstelle von NEP führte also zu einer leichten Überexpression. Das Transkriptionsmuster während der Entwicklung änderte sich hingegen nicht signifikant durch den Ersatz des NEP-Promotors durch den PEP-Promotor.

Abbildung 26B stellt die Transkriptmengen von Δ NEP/*accD* im Vergleich zum Wildtyp 7 d nach Aussaat dar. Die Transkriptlevel der beiden transplastomischen Linien waren nur wenig niedriger als im Wildtyp. Dies reproduzierte das Ergebnis, das auch mittels *Northern Blot* erhalten wurde.

3.1.6.3 Die RNA-Mengen in PEP/*rpoB* sind verringert

Auch für PEP/*rpoB* sollten die Transkriptmengen von *rpoB* mit denen des Wildtyps verglichen werden. Durch *Northern Blot* war dies nicht möglich, da mit unterschiedlichen Gelsystemen, Sonden, RNA-Mengen und sogar angereicherter Chloroplasten-RNA stets nur ein Schmier detektiert werden konnte. Daher wurden die Transkriptlevel zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung mittels qRT-PCR bestimmt (s. Abb. 27). Das Transkriptmuster von PEP/*rpoB* unterschied sich kaum von dem des Wildtyps. Der höchste Transkriptlevel wurde 3 d nach Aussaat beobachtet. Danach nahm die Transkriptmenge im Wildtyp stetig ab. Abgesehen vom 3 d-Signal korrelierte dieser Verlauf mit dem in den *primer extension* Analysen beobachteten Muster. In der transplastomischen Linie stagnierte die Transkriptmenge zwischen 7 und 14 d nach Aussaat und nahm dann weiter ab. Im gesamten Verlauf lag die Transkriptmenge der Mutante unterhalb der des Wildtyps. Die Transkription durch PEP statt durch NEP führte also nicht zu einer Überexpression. Vielmehr schien PEP die Funktion von NEP nicht vollständig zu kompensieren. Überraschend war die sehr große Transkriptmenge in den 3 d-Proben. In den *primer extension* Analysen konnte für 3 d alte Pflanzen kein Signal detektiert werden. Daher scheint es unwahrscheinlich, dass die qRT-PCR-Signale tatsächlich auf eine große Menge vollständiger Transkripte zurückzuführen sind. Da schon im Samen *rpoB*-Transkripte vorliegen (Demarsy *et al*, 2006), könnten die Signale auch teilweise aus Abbauprodukten dieser initialen Transkripte resultieren.

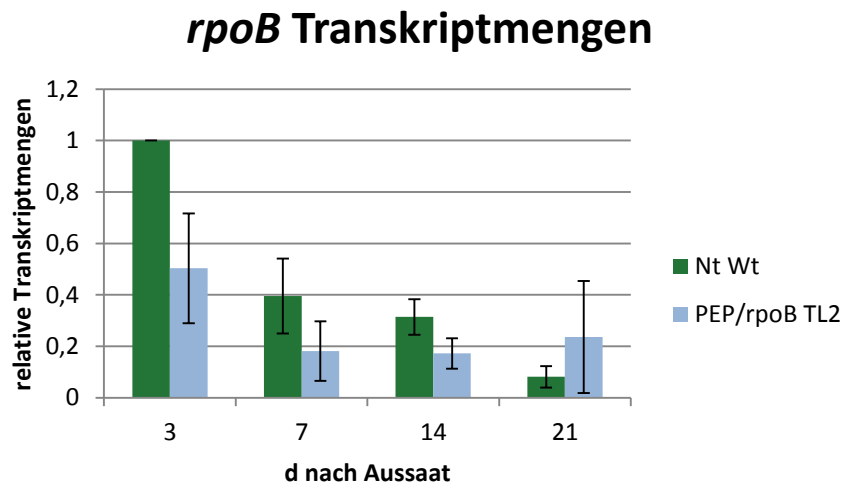


Abb. 27: qRT-PCR Analyse der *rpoB*-Transkriptmengen in der transplastomischen Linie PEP/*rpoB* TL2. Die transplastomische Linie und der Wildtyp (Nt Wt) wurden auf Erde unter Standardbedingungen angezogen. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung aber stets zur selben Tageszeit wurden Proben für die RNA-Präparation genommen. Für die Analyse wurden 2 µg RNA eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Transkriptmengen aus 2 biologischen Replikaten mit 2 bzw. 3 technischen Replikaten für PEP/*rpoB* TL2 und den Wildtyp. Zur Verrechnung der technischen Replikate wurde der 3 d-Wildtyp-Wert auf 1 normiert. Die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

Das *rpoB/C1/C2* Operon hat eine besondere Stellung, da es für PEP-Untereinheiten kodiert. Insofern ist es interessant zu untersuchen, ob die Promotorveränderung auch einen globalen Effekt auf PEP-transkribierte Gene hat. Daher wurden *Northern Blot* Analysen mit RNA von PEP/*rpoB* TL2 bzw. TL1 und dem Wildtyp mit spezifischen Sonden für *psb*-Gene durchgeführt (s. Abb 28). Für die beispielhaft gewählten Gene *psbA* und *psbD* war zu den verschiedenen Zeitpunkten der Chloroplastendifferenzierung (s. Abb. 28A) kein Unterschied der Transkriptmengen zwischen Wildtyp und transplastomischer Linie zu erkennen. Dasselbe Ergebnis wurde für *psbE* (nicht gezeigt) erhalten. Auch in Wildtyp- und PEP/*rpoB*-Samen, welche nur 1 bzw. 2 d in Wasser unter Standard-Lichtbedingungen zur Keimung belassen wurden (s. Abb. 28B), wurden keine Unterschiede der *psbA*-, *psbD*- und *psbE*-Transkriptmengen detektiert (*psbE* nicht gezeigt). Somit wurden zwar die Transkriptmengen von *rpoB* durch den Austausch des NEP-Promotors gegen den PEP-Promotor beeinflusst, nicht jedoch die Level der durch PEP transkribierten Gene. Dies ließ bereits vermuten, dass trotz veränderter Transkriptmenge kein Einfluss auf Proteinebene für RpoB vorliegt.

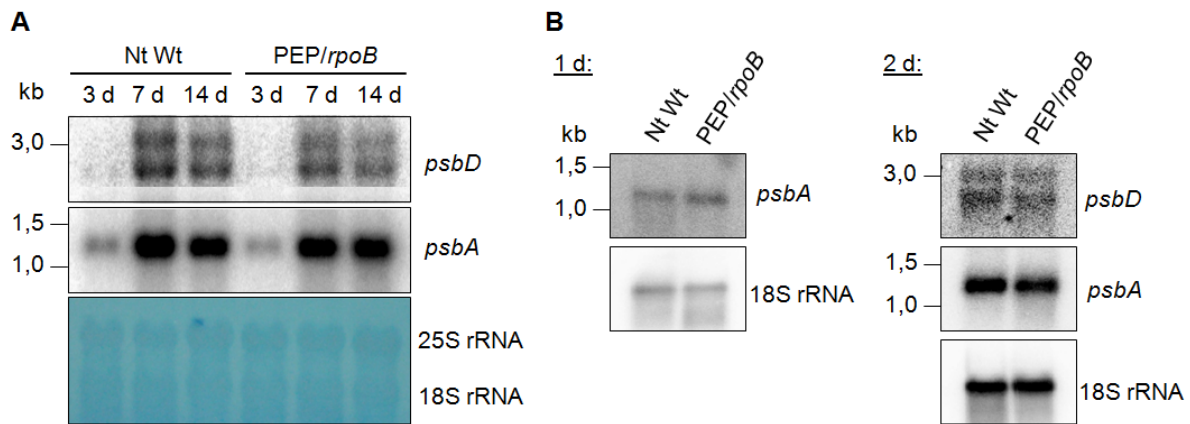


Abb. 28: Northern Blot Analyse der *psb*-Transkriptmengen in der transplastomischen Linie PEP/*rpoB* TL2 bzw. TL1. **A** Die transplastomische Linie sowie der Wildtyp (Nt Wt) wurden unter Standardbedingungen auf Erde angezogen und 14 d nach Aussaat Proben für die RNA-Präparation genommen. 10 µg RNA wurden im 1 %igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit spezifischen Sonden für *psbA* und *psbD* hybridisiert. Zum Abgleich der Transkriptgrößen wurde ein RNA-Marker (RiboRuler™ RNA Ladder High Range, Fermentas) parallel im Gel mit aufgetrennt. Die Positionen der Markerbanden sind gekennzeichnet. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung des Gels wurde die Membran mit Methylenblau gefärbt und die Banden der 25S und 18S rRNA dokumentiert. **B** PEP/*rpoB* TL1 und der Wildtyp wurden 1 bzw. 2 d in sterilem Wasser unter Standard-Lichtbedingungen belassen. 1 µg (1d) bzw. 5 µg RNA wurden für den Northern Blot eingesetzt. Als Beladungskontrolle wurde die 18S rRNA mit einer spezifischen Sonde detektiert.

Da die *aadA*-Kassette der für *trnC* kodierenden Sequenz vorgeschaltet ist, wurde überprüft, ob durch ein mögliches Durchlesen der Kassette die Transkriptmenge von *trnC* beeinflusst wird, da dies wiederum Einfluss auf die Genexpression der Mutante haben kann. In Northern Blot Analysen konnte keine Veränderung der *trnC*-Transkriptlevel beobachtet werden (nicht gezeigt), sodass ein derartiger Einfluss der Kassette ausgeschlossen werden konnte.

3.1.7 Die Edierung der *rpoB*-Transkripte wird nicht beeinflusst in PEP/*rpoB*

An der Regulation der plastidären Genexpression sind verschiedene posttranskriptionelle Prozesse beteiligt (Übersicht in Barkan, 2011). So ist z.B. bekannt, dass plastidäre mRNAs ediert werden (Übersicht in Chateigner-Boutin and Small, 2010). Dies trifft auch für *rpoB* aus Tabak zu. Im Kodon 667 wird ein C zu einem U ediert, sodass statt der Aminosäure Serin Phenylalanin kodiert wird (Tillich *et al.*, 2006). Für die transplastomischen Linien PEP/*rpoB* TL1 und 2 wurde daher untersucht, ob der Gebrauch einer anderen RNA-Polymerase (PEP statt NEP) die Edierung der resultierenden *rpoB*-Transkripte beeinflusst. Dafür wurde Gesamt-RNA des Wildtyps und der transgenen Linien von genomischer DNA befreit und zur reversen Transkription mit einem *rpoB*-spezifischen Oligonukleotid eingesetzt. Die resultierenden cDNA-Fragmente wurde mittels PCR amplifiziert, in pGEM®-T kloniert und sequenziert (s. 2.2.9.21). Als Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase mitgeführt. PCR-Signale (nicht gezeigt) in den Kontrollen resultierten somit aus verbliebener

genomischer DNA. Die entsprechenden Fragmente zeigten erwartungsgemäß die Sequenz TCT im Kodon 667. Für den Wildtyp wurde nach reverser Transkription die aus der C nach U Edierung folgende Sequenz TTT gefunden. Trotz der geringen, vorhandenen Mengen an restlicher genomischer DNA zeigten auch 100 % der für PEP/*rpoB* TL1 und TL2 sequenzierten Klone die Sequenz TTT. Demnach hatte die Transkription von *rpoB* durch PEP statt durch NEP keinen Einfluss auf die Edierung. Da aus Zeitgründen jeweils nur 30 Sequenzen für den Wildtyp, und beide transplastomische Linien ausgewertet wurden, sollte der Versuch für eine statistische Auswertung wiederholt werden.

3.1.8 Auswirkungen der Promotorveränderungen auf Protein-Ebene

Um die Auswirkungen der Promotorveränderungen auf Protein-Ebene zu untersuchen, wurden die transplastomischen Linien PEP/*accD* TL2, Δ NEP/*accD* TL2 und TL21 sowie PEP/*rpoB* TL2 auf Erde angezogen. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Aussaat wurden Proben genommen (jeweils zum selben Tageszeitpunkt) und Protein isoliert (s. 2.2.10.1). Für die *Western Blot* Analyse (s. 2.2.10.4) wurden jeweils gleiche Mengen Protein (30-50 μ g) in der SDS-PAGE (s. 2.2.10.3) aufgetrennt. Die gleichmäßige Beladung wurde nach Transfer der Proteine auf eine Nylonmembran durch Ponceau-Färbung oder durch Immunodetektion der großen Untereinheit der RubisCo (RbcL) überprüft. Abbildung 29A zeigt zwei Wiederholungen der Untersuchung der Proteinmengen von RpoB in Wildtyp und PEP/*rpoB* TL2. Die mit dem Antikörper detektierte Bande migrierte entsprechend der erwarteten Größe von ca. 120 kDa (ProtParam, <http://web.expasy.org/protparam/>). Es waren keine signifikanten Unterschiede der Proteinmenge zwischen PEP/*rpoB* und dem Wildtyp zu unterschiedlichen Zeiten der Chloroplastendifferenzierung zu erkennen. Die geringfügig stärkeren Signale in der Mutante bei 10 und 21 d (oben) bzw. 7 und 14 d (unten) nach Aussaat wurden in den Wiederholungen jeweils nicht bestätigt. Die Proteinmenge von RpoB wurde durch die Transkription von *rpoB* durch PEP statt NEP demnach nicht beeinflusst. Die geringeren Transkriptmengen spiegelten sich nicht auf Proteinebene wider.

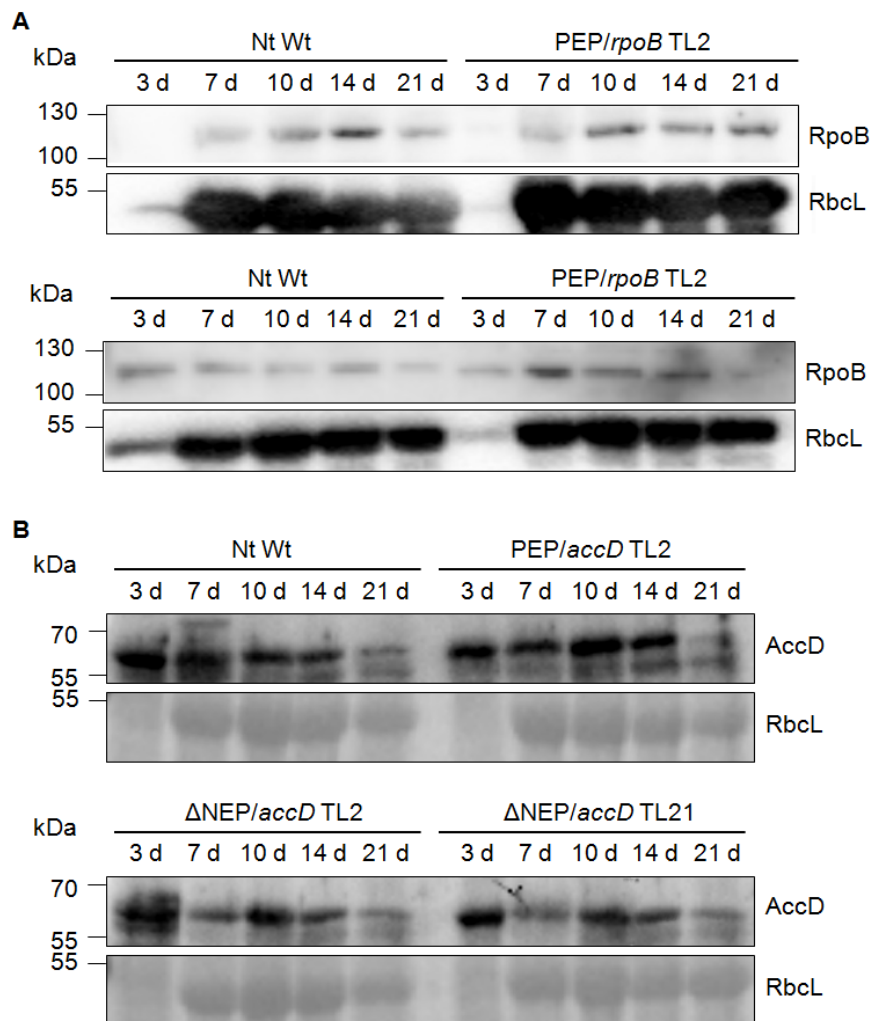


Abb. 29: Western Blot Analysen der transplastomischen Linien PEP/*accD* TL2, ΔNEP/*accD* TL2 und TL21, sowie PEP/*rpoB* TL2. Die Pflanzen wurden unter Standardbedingungen auf Erde angezogen. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aussaat und zur selben Tageszeit wurden Proben für die Proteinpräparation genommen. 50 µg Protein wurden im 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Zur Größenstandardisierung wurde ein Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) parallel im Gel aufgetrennt. Die Größen sind in kDa angegeben. Nt Wt = Wildtyp. **A** Analyse von PEP/*rpoB* TL2 und Wildtyp mit Anti-RpoB Antikörper. Zur Beladungskontrolle wurde RbcL mit Anti-RbcL detektiert. Dargestellt sind zwei Wiederholungen des Versuchs. **B** Analyse von PEP/*accD* TL2, ΔNEP/*accD* TL2 und TL21 sowie Wildtyp mit Anti-AccD Antikörper. Zur Beladungskontrolle wurden die Membranen mit Ponceau gefärbt und die RbcL-Bande dokumentiert.

Die leichte Überexpression, die auf RNA-Ebene für PEP/*accD* beobachtet wurde, spiegelte sich geringfügig auf Proteinebene wieder (Abb. 29B). Die detektierte Bande migrierte entsprechend der vorhergesagten Größe von 58 kDa (ProtParam, <http://web.expasy.org/protparam/>; vergleiche auch Madoka *et al.*, 2002). 10 d und 14 d nach Aussaat war die AccD-Menge in PEP/*accD* leicht erhöht. Dies konnte in einer Wiederholung des Versuchs bestätigt werden (nicht gezeigt). Für die anderen Zeitpunkte waren keine wesentlichen Unterschiede erkennbar. Die Linien ΔNEP/*accD* TL2 und TL21 zeigten trotz Ausschalten von *PaccD*-255 wildtypische Signale für alle Probenzeitpunkte. Lediglich bei 7 d

war eine leichte Verringerung der Proteinmenge zu beobachten. Da die Pflanzen nicht homoplastomisch waren, war zu erwarten, dass *accD*-Transkripte und folglich auch AccD detektierbar sind. Jedoch entsprachen die Proteinmengen den Wildtypmengen, was allein durch die wenigen wildtypischen Plastome theoretisch nicht gewährleistet werden konnte. Diese Resultate konnten in zwei weiteren Versuchen reproduziert werden.

Für die Linie PEP/*rpoB* TL2 wurde außerdem RpoA im *Western Blot* detektiert (nicht gezeigt). Es wurde kein Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp beobachtet. In PEP/*rpoB* war also die Menge an PEP nicht verändert. Dementsprechend waren auch keine Effekte auf durch PEP transkribierte Gene zu beobachten (s. 3.1.5.3, Abb. 28). Auf Proteinebene konnte dies beispielhaft für *psbA* bestätigt werden (nicht gezeigt).

3.1.9 Auswirkungen der Promotoraustausche für *accD*, *rpoB* und *rrn16*

Das Ausschalten des NEP-Promotor von *rrn16* führte zwar zu einer leicht verzögerten Entwicklung der transplastomischen Keimlinge, hatte jedoch keine Auswirkungen auf die *steady state* Transkriptmengen von Pflanzen unterschiedlichen Alters. Die Transkription ausschließlich vom PEP-Promotor reichte schon während der Keimung aus um eine nahezu wildtypische Entwicklung zu gewährleisten. Der Ersatz des *rpoB* NEP-Promotors durch einen PEP-Promotor hingegen führte während der Keimung und der ersten Tage der Chloroplastendifferenzierung zu einer offensichtlichen Wachstumsverzögerung, der Aktivierung einer alternativen TSS, und gegenüber dem Wildtyp verringerten Transkriptlevel, welche jedoch nicht auf Proteinebene widerspiegelt wurden. In frühen Entwicklungsstadien konnte PEP die Funktion von NEP also nicht vollständig ausgleichen. Andererseits bewirkte der Ersatz des *accD* NEP-Promotors durch einen PEP-Promotor eine leichte Überexpression von *accD*, welche in den ersten Tagen nach Aussaat auch auf Proteinebene beobachtet werden konnte. Außerdem wurden trotz des Ausschaltens des *accD*-Promotors annähernd wildtypische Transkript- und Proteinmengen detektiert. Sowohl das Ausschalten des NEP-Promotors als auch sein Ersatz durch einen PEP-Promotor führten zur Aktivierung neuer TSSs. Somit kann nicht von einer ausschließlich sequentiellen Arbeitsteilung von PEP und NEP ausgegangen werden. Vielmehr muss die entwicklungsspezifische Rolle der beiden plastidären Transkriptionssysteme für verschiedene Gene in Abhängigkeit von ihrer Funktion individuell diskutiert werden.

3.2 Suche nach potentiellen Transkriptionsfaktoren von RpoTs

In vitro Transkriptionsstudien haben gezeigt, dass die rekombinanten *Arabidopsis* RpoTp und RpoTm ohne Hilfsfaktoren in der Lage sind, die Transkription an mitochondrialen und plastidären Promotoren zu initiieren (Kühn *et al.*, 2007). Allerdings wurden einige Promotoren nicht erkannt und für RpoTm konnte *in vitro* keine signifikante Promotorspezifität beobachtet werden. Daraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass die RpoTs *in vivo* Faktoren zur spezifischen Promotorerkennung benötigen. Bisherige Versuche derartige Transkriptionsfaktoren zu identifizieren und deren transkriptionsstimulierende Wirkung nachzuweisen, schlugen fehl (zusammengefasst in Liere *et al.*, 2011). Daher wurde in dieser Arbeit versucht, mit neuen Ansätzen potentielle Interaktionspartner der RpoTs, welche als Transkriptionsfaktoren fungieren könnten, zu identifizieren. Als erster Ansatz wurde RpoTp aus Tabak *in vivo* mit einem N-terminalen Epitop-tag exprimiert und für Co-Immunopräzipitationsversuche eingesetzt.

3.2.1 *In vivo* Expression und IP Epitop-markierter RpoTp in Tabak

Im allotetraploiden *N. tabacum* existieren sechs *RpoT*-Sequenzen (Hedtke *et al.*, 2002). Dabei handelt es sich um zwei orthologe Sets von Genen aus jeweils *RpoTp*, *RpoTm* und *RpoTm*, welche auf die Ursprungsspezies *N. tomentosiformes* und *N. silvestris* zurückzuführen sind. Zur konstitutiven *in vivo* Expression Epitop-markierter Tabak-RpoTp wurden durch Dr. Karsten Liere (HU Berlin/Genetik) *N. tabacum* Wildtyppflanzen mit Vektoren stabil transformiert, in welchen der *RpoTp*-Sequenz von *N. silvestris* N-terminal verschiedene Epitopsequenzen vorgeschaltet waren. Dabei wurden die jeweiligen Epitopsequenzen zwischen denjenigen Teil von *RpoTp*, der für das vorhergesagte Transitpeptid zur Translokation in die Chloroplasten kodierte, und den Teil von *RpoTp*, der für das funktionale Enzym kodierte, kloniert (s. Abb. 30). Dieses Konstrukt wurde in den Transformationsvektor pBI121 übertragen, sodass die Expression in der Pflanze vom 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus aus erfolgte. HFS-NtRpoTp-Pflanzen, die nachfolgend als HFS-Tp bezeichnet werden, exprimierten *N. silvestris* RpoTp mit einer Kombination aus HA- (Hämagglutinin des Humanen Influenzavirus; YPYDVPDYA; Wilson *et al.*, 1984), 1xFLAG- (DYKDDDDK; Einhauer und Jungbauer, 2001) und StrepII-tag (WSHPQFEK; Schmidt und Skerra, 2007). VMF-NtRpoTp (VMF-Tp) exprimierte RpoTp mit einer Kombination aus VSV- (Vesikuläres Stomatitis-Virus Glykoprotein; YTDIEMNRLGK; Hanover, 1988), cMyc- (EQKLISEEDL; Evan *et al.*, 1985) und 1xFLAG-tag. E2-NtRpoTp (E2-Tp)

exprimierte RpoTp mit einem E2-tag (Rinder-Pappillomavirus Typ-1 Transaktivator Protein E2; SSTSSDFRDR; Kurg *et al.*, 1999).

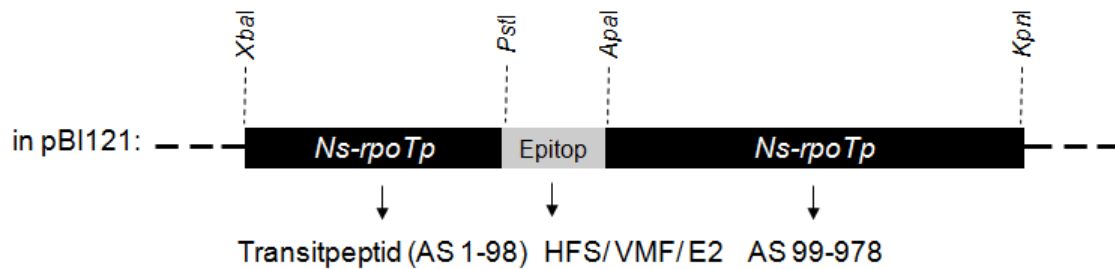


Abb. 30: Schematische Darstellung des Klonierungsprinzips für die Eritop-RpoTp-exprimierenden Tabakpflanzen. In den Transformationsvektor pBI121 wurde die für RpoTp von *N. silvestris* kodierende Sequenz inklusive verschiedener für die Epitope kodierenden Sequenzen kloniert. Die Epitopsequenz ist der Sequenz, die für das durch TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2000) vorhergesagte Transitpeptid kodiert, nachgeschaltet. Ns = *Nicotiana silvestris*, AS = Aminosäure, HFS = HA-FLAG-StrepII, VMF = VSV-cMyc-FLAG.

Diese Pflanzen wurden von Dr. Karsten Liere freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die verschiedenen Linien der drei transgenen Tabakvarianten wurden zunächst auf ihre Expression der jeweiligen Epitop-markierten RpoTp hin untersucht. Hierfür wurden Chloroplasten isoliert (s. 2.2.6) und lysiert. Die im Stroma vorhandenen Proteine wurden im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.2.10.3) und im *Western Blot* (s. 2.2.10.4) mit verschiedenen Epitop-spezifischen Antikörpern analysiert. Abbildung 31 zeigt einige Beispiele solcher *Western Blots*. Für HFS-RpoTp wurde die Expression sowohl mit Anti-FLAG-Antikörper, als auch mit verschiedenen Anti-HA-Antikörpern und Anti-StrepII-Antikörper untersucht. Anti-StrepII lieferte keine Signale (nicht gezeigt) wohingegen mit Anti-FLAG und mit Anti-HA (aus der Ratte, s. 2.1.6, Tab. 3) die HFS-markierte RpoTp nachgewiesen werden konnte (Abb. 31A, Spur 3 und Abb. 31B). Während mit dem HA-Antikörper nur eine Bande, die bei etwa 110 kDa migrierte, und kein Signal in der Wildtyp-Kontrolle detektiert wurde, wurden durch Anti-FLAG zwei Banden für HFS-Tp und auch VMF-Tp sowie eine Bande im Wildtyp sichtbar (Abb. 31A). Auch Liere *et al.* (2004) detektierten in Tabakpflanzen, welche 3xFLAG-fusionierte RpoTp überexprimierten, eine auch im Wildtyp sichtbare, unspezifische Bande bei 120 kDa und die Polymerase-Bande bei ca. 110 kDa. Bei der oberen Bande handelte es sich demnach um eine Kreuzreaktion mit dem Antikörper, während die untere Bande die Epitop-markierte Polymerase repräsentierte, deren Molekulargewicht durch ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) mit ca. 105 kDa vorhergesagt wurde. Ein cMyc-spezifischer Antikörper lieferte keine Signale für VMF-Tp (nicht gezeigt). Die E2-markierte RpoTp konnte durch einen Anti-E2 Antikörper nicht nachgewiesen werden. Auch größere Mengen Protein und andere Modifikationen des

Protokolls ermöglichten keine Detektion. Folgernd aus den Immunodetektionen wurden für die nachfolgenden Immunopräzipitationsversuche die Antikörper Anti-FLAG und Anti-HA ausgewählt.

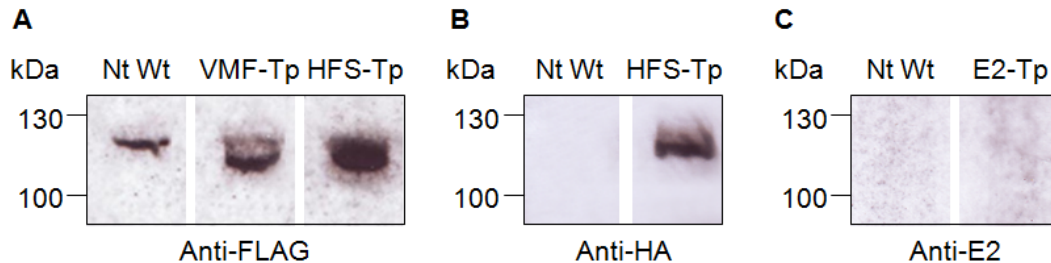


Abb. 31: Immunodetektion der Epitop-markierten RpoTp in den transgenen Pflanzen HFS-Tp, VMF-Tp und E2-Tp. Die Pflanzen wurden unter Standardbedingungen auf Erde angezogen. Von zwei Monate alten transgenen Pflanzen und vom Wildtyp (Nt Wt) wurden Chloroplasten isoliert und lysiert. 20-50 µg Stroma-Protein wurden parallel zu einem Molekulargewichtsmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) im 7,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt und zur Immunodetektion auf Nylonmembranen transferiert. Die Marker-Banden sind in kDa gekennzeichnet. HFS = HA-FLAG-StrepII, VMF = VSV-cMyc-FLAG. **A** Detektion der *in vivo* exprimierten Epitop-markierten Tabak-RpoTp mit Anti-FLAG Antikörper. **B** Detektion mit Anti-HA Antikörper (aus der Ratte). **C** Detektion mit Anti-E2 Antikörper.

Die Auswahl der zu verwendenden Linien wurde weiter eingeschränkt durch die Analyse der Funktionalität der Epitop-markierten RpoTps. Hierzu wurde mittels *primer extension* Analyse (s. 2.2.9.17) die Nutzung der verschiedenen Promotoren von *atpB* untersucht. Das Gen *atpB* wird von unterschiedlichen PEP- und NEP-Promotoren aus transkribiert. Da der 35S-Promotor theoretisch zu einer Überexpression führt, kann durch die verstärkte Nutzung eines NEP-Promotors auf die Funktionalität der *getaggen* Phagentyp-RNA-Polymerase geschlossen werden. Abbildung 32 zeigt beispielhaft das Ergebnis einer solchen Analyse. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Typ-I NEP-Promotor *PatpB-329* (schwarzer Pfeil) in den transgenen Linien verstärkt genutzt wurde. Sogar für E2-Tp konnten positive Linien identifiziert werden, obwohl auf Proteinebene keine Expression nachweisbar war. Diejenigen Linien der transgenen Varianten, die sowohl eine gesteigerte Promotornutzung als auch eine Expression auf Proteinebene zeigten, demnach also eine funktionale Epitop-markierte RpoTp überexprimierten, wurden für die nachfolgenden Versuche verwendet.

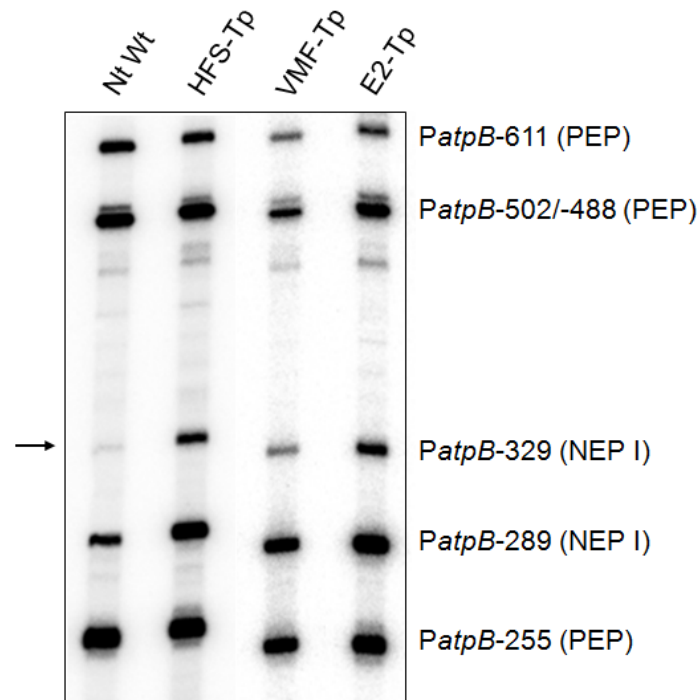


Abb. 32: *Primer extension* Analyse der Epitop-RpoTp exprimierenden Tabakpflanzen HFS-Tp, VMF-Tp und E2-Tp. Die transgenen Pflanzen sowie der Wildtyp (Nt Wt) wurden unter Standardbedingungen angezogen und von 4 Wochen alten Pflanzen wurde RNA extrahiert. 10 µg Gesamt-RNA wurden für die Reaktion mit dem *atpB*-spezifischen Oligonukleotid eingesetzt. Die Auftrennung der Produkte erfolgte im 4 %igen Sequenzgel. Die durch die detektierten Banden repräsentierten Promotoren sind gekennzeichnet. Der schwarze Pfeil kennzeichnet *PatpB-329*, für den die veränderte Promotornutzung beobachtet werden konnte.

Für die Immunopräzipitation (s. 2.2.10.6) wurden Chloroplasten isoliert und Stroma hergestellt (s. 2.2.6). Pro IP wurden mindestens 500 µg Protein eingesetzt und erst mit 5 µg des Antikörpers (Anti-FLAG bzw. Anti-HA) und anschließend mit rec-Protein-A-Sepharose® 4B (Invitrogen) inkubiert. Inkubationszeiten und -temperaturen, Sepharosemengen, Puffer und Elutionsmethoden wurden in zahlreichen Versuchen variiert (s. 2.2.10.6). Abbildung 33 zeigt zwei Beispiele für das Resultat der IPs. Es ist zu erkennen, dass sowohl die Polymerase-Bande als auch die durch den FLAG-Antikörper unspezifisch angefärbte Bande durch die IP im Stroma abgereichert wurden. Die Signale wurden trotz gleicher Auftragsmengen schwächer. Dennoch konnte keine eindeutige, präzipitierte Bande im Eluat beobachtet werden. Die Bande im Eluat der VMF-Tp-IP (Abb. 33B) entsprach in ihrem Laufverhalten der unspezifischen Bande. Dies konnte in dieser Form reproduziert werden (nicht gezeigt). Dennoch wurden Eluate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele zur Identifizierung zusätzlicher Banden gefärbt. Sowohl die kolloidale Coomassie-Färbung als auch eine Silberfärbung (s. 2.2.10.3) machten keine präzipitierte RpoTp sichtbar. Entweder war die Menge an präzipitierter Polymerase zu gering oder die IP funktionierte trotz zahlreicher Modifikationen nicht.

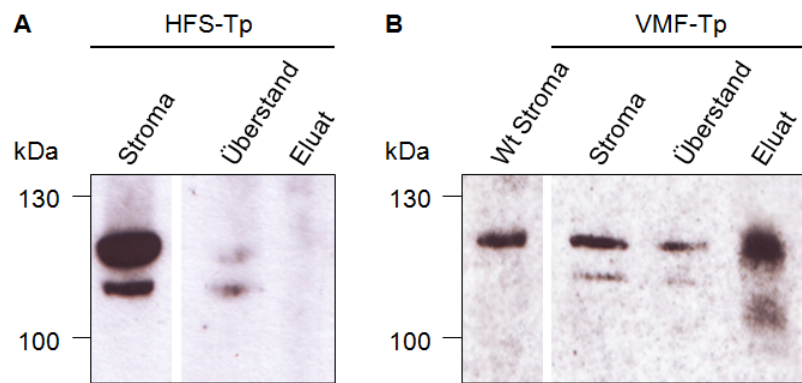


Abb. 33: Immunopräzipitationsversuche und anschließender *Western Blot* mit den transgenen Tabakpflanzen HFS-Tp und VMF-Tp. 200 µl des aus 14 d alten HFS-Tp- bzw. VMF-Tp-Pflanzen und dem Wildtyp (Nt Wt) extrahierten Stromas wurden mit 5 µg Anti-FLAG Antikörper 3 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde 100 µl rec-Protein-A-Sepharose® 4B (Invitrogen) zugegeben. Nach dreimaligem Waschen mit Co-IP-Puffer 1 erfolgte die Elution mit 1x Ladepuffer, die anschließende Auftrennung der Eluate sowie der 10 µl-Aliquots von Stroma und IP-Überstand im 7,5 %igen SDS-Gel und der Transfer auf Nylonmembranen zur Immunodetektion mit Anti-FLAG Antikörper. Zum Größenabgleich wurde ein Molekulargewichtsmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) parallel im Gel laufen gelassen. Die Marker-Banden sind in kDa eingezeichnet. **A** HFS-Tp IP. HFS = HA-FLAG-StrepII. **B** VMF-Tp IP. VMF = VSV-cMyc-FLAG.

Um zu überprüfen, ob die Antikörper eventuell nur eine denaturierte Epitop-markierte RpoTp präzipitieren, da für ihre Herstellung denaturierte Peptide verwendet werden, wurde das Stroma durch Hitze (10 min bei 85 °C) oder Zusatz von 5M Harnstoff (mit anschließender Dialyse) denaturiert (s. 2.2.10.6) und für die IP eingesetzt. Auch mit diesen Verfahren konnten HFS- bzw. VMF-RpoTp nicht präzipitiert werden (nicht gezeigt). Schließlich wurde durch UV-Bestrahlung versucht, den Antikörper an die Epitop-markierte RpoTp zu koppeln um eine Präzipitation zu ermöglichen. Auch diese Versuche verliefen ohne Erfolg (nicht gezeigt). Daher wurden nachfolgend andere Ansätze verfolgt.

3.2.2 *Pulldown assays mit N. tabacum und A. thaliana*

Als weiterer Ansatz für die Suche nach potentiell mit den RpoTs interagierenden Proteinen wurde der *pulldown assay* gewählt. Hierzu wurden die RpoTs aus Tabak und *Arabidopsis* heterolog mit verschiedenen Affinitäts-tags in *E. coli* exprimiert (s. 2.2.13.2), gereinigt und für Präzipitationsversuche mit Stroma der jeweiligen Wildtyppflanze eingesetzt.

3.2.2.1 **Heterologe Expression und Reinigung von 6xHis-At/Nt-RpoTp und 6xHis-At/Nt-RpoTmp**

Plasmide für die Expression von 6xHis-markierten *Arabidopsis* RpoTs (pCold-His-AtRpoTm, pCold-His-AtRpoTp und pCold-His-AtRpoTmp) wurden von Alexandra-Viola Bohne im Rahmen ihrer Dissertation kloniert (Bohne, 2009; s. 2.1.4, Tab. 2). Entsprechende Plasmide zur Expression der Tabak RpoTs wurden ebenfalls von Frau Bohne produziert und

freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Für die Versuche wurden lediglich die Plasmide zur Expression von RpoTp und –Tnp genutzt. Das pCold-System (TaKaRa) ermöglichte die Induktion der Expression der Fusionsproteine durch Kälteschock. Zusätzlich wurde die Expression durch Zusatz von IPTG induziert (s. 2.2.10.7.2). Die Reinigung der 6xHis-RpoTs erfolgte mittels Affinitätschromatographie über Ni^{2+} -NTA-Agarose (s. 2.2.10.7.3). Abbildung 34 zeigt die Überexpression und Reinigung der rekombinanten Polymerasen am Beispiel von 6xHis-AtRpoTp, sowie die affinitätsgereinigten Formen von 6xHis-At- und NtRpoTnp.

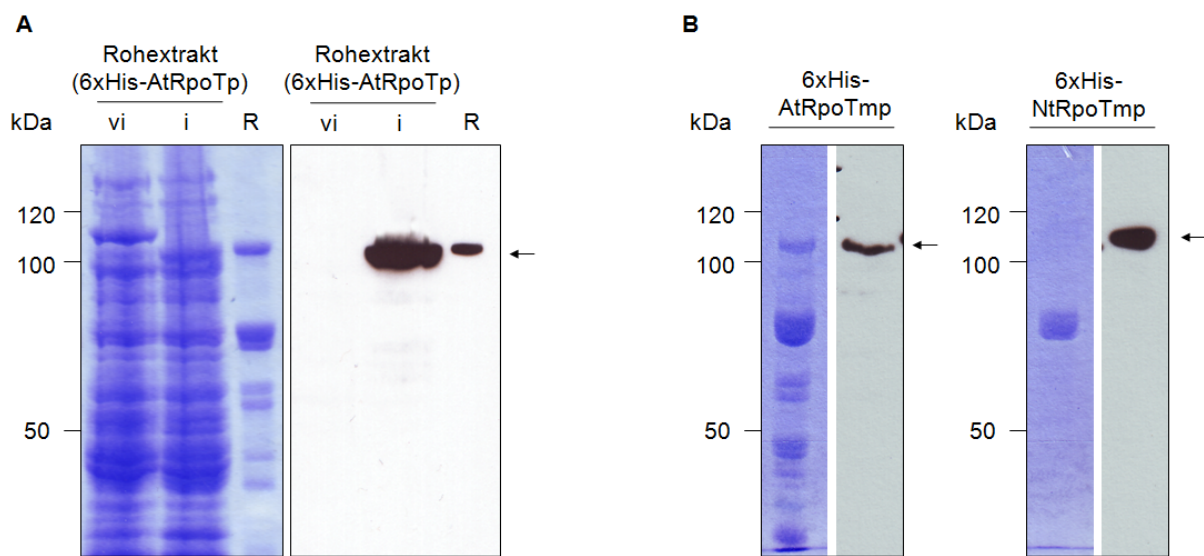


Abb. 34: Überexpression und Reinigung rekombinanter 6xHis-fusionierter RpoTs. **A** Mit pCold-His-AtRpoTp transformierte *E. coli* BL21-Zellen wurden wie in 2.2.13.2 beschrieben kultiviert. Die Expression von 6xHis-AtRpoTp wurde durch Kälteschock und 1 mM IPTG induziert und erfolgte bei 15 °C üN. Aliquots von Rohextrakten der Kultur vor (vi) und nach der Induktion (i) wurden zusammen mit einem Aliquot nach Reinigung (R) durch Ni^{2+} -Affinitätschromatographie im 7,5 %igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt (links) bzw. für die Immunodetektion der rekombinanten Polymerase mit Anti-His Antikörper wurden die Proteine auf eine Nylonmembran transferiert (rechts). Zum Größenabgleich wurde ein Marker (PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Fermentas) parallel im Gel aufgetrennt. Die Größen sind in kDa angegeben. Die 6xHis-AtRpoTp-Bande (schwarzer Pfeil) korrespondierte in der Größe mit dem vorhergesagten Molekulargewicht (ProtParam) von 115 kDa. **B** Im 7,5 %igen Gel parallel zum Marker (PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Fermentas) aufgetrennte Reinigungsfraktionen nach Expression von 6xHis-AtRpoTp bzw. 6xHis-NtRpoTnp durch mit pCold-His-AtRpoTp bzw. pCold-His-NtRpoTnp transformierte *E. coli* BL21-Zellen. Die Gele wurden sowohl für eine Coomassie-Färbung (links) als auch für die Immunodetektion (rechts) mit Anti-His Antikörper eingesetzt. Schwarze Pfeile kennzeichnen die rekombinanten Polymerasen, die entsprechend ihres vorhergesagten Molekulargewichts (ProtParam) von 116 kDa bzw. 111 kDa im Gel migrierten.

Im Coomassie-gefärbten Gel war in den gereinigten Fraktionen eine deutliche Anreicherung der rekombinanten Phagentyp-RNA-Polymerasen zu erkennen, die entsprechend ihrer erwarteten Größen (115 kDa für 6xHis-AtRpoTp, 116 kDa für 6xHis-AtRpoTnp und 111 kDa für 6xHis-NtRpoTnp; ProtParam, Gasteiger *et al.*, 2005) migrierten und deren Identität durch Immunodetektion des 6xHistidin-tags bestätigt wurde. Die 6xHis-NtRpoTnp-Bande

war kaum erkennbar, jedoch zeigte der *Western Blot*, dass auch in dieser Reinigungsfraction rekombinantes Protein vorlag. Neben der Polymerase-Bande waren jeweils auch einige unspezifisch mitgereinigte Banden zu erkennen. Um den Einfluss dieser Proteine bei den nachfolgenden *pulldown assays* zu kontrollieren wurden *E. coli* BL21-Zellen mit dem leeren pCold I-Vektor transformiert und für die Überexpression und Reinigung eingesetzt. Die resultierende Reinigungsfraction, welche neben dem 6xHis-Peptid auch die unspezifisch gebundenen Proteine enthielt, wurde für Folgeversuche als Kontrolle mitgeführt. Für 6xHis-NtRpoTp gelang die Überexpression nicht.

Die Expression mit dem pCold-System war insofern schwierig, als nur bei sehr wenigen Klonen eine Überexpression beobachtet wurde und diese bei einer zweiten Anzucht bereits nicht reproduzierbar war, und als die Expressionslevel insgesamt niedrig waren. Daher wurde ein anderes System zur Expression 6xHis-markierter RpoTs entwickelt: pJS-HisEx (s. 2.1.4, Tab. 2 und 2.2.10.7.1). Die Nukleotidsequenzen der Polymerasen AtRpoTp, AtRpoTmp, NtRpoTp und NtRpoTmp wurden aus den pCold-basierten Expressionsplasmiden amplifiziert und in pJS-HisEx kloniert. Mit diesem System war die Überexpression zumindest für 6xHis-AtRpoTp und 6xHis-AtRpoTmp leichter zu erzielen (nicht gezeigt), und die Expressionslevel sowie die Menge an gereinigter 6xHis-markierter Polymerase waren größer, sodass ausreichende Mengen für mehrere *pulldown assays* gewonnen werden konnten.

3.2.2.2 Pulldown assays mit 6xHis-At/Nt-RpoTp und 6xHis-At/Nt-RpoTmp

Für einen *pulldown assay* wurden 10-15 µg des rekombinanten Proteins oder der Kontrollfraction (s. 3.2.2.1) eingesetzt und entweder zuerst mit Ni²⁺-NTA-Agarose und anschließend mit Stroma des Tabak- bzw. *Arabidopsis*-Wildtyps inkubiert oder umgekehrt (s. 2.2.14). Es wurden Inkubationszeiten und -temperaturen, Stromamengen, Sepharosemengen sowie Puffer variiert (s. 2.2.14), um eine möglichst effiziente Bindung der potentiellen Interaktionspartner zu ermöglichen. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele mit kolloidalem Coomassie oder Silber gefärbt (s. 2.2.10.3). Abbildung 35 zeigt ein Beispiel für einen *pulldown assay* mit 6xHis-AtRpoTmp.

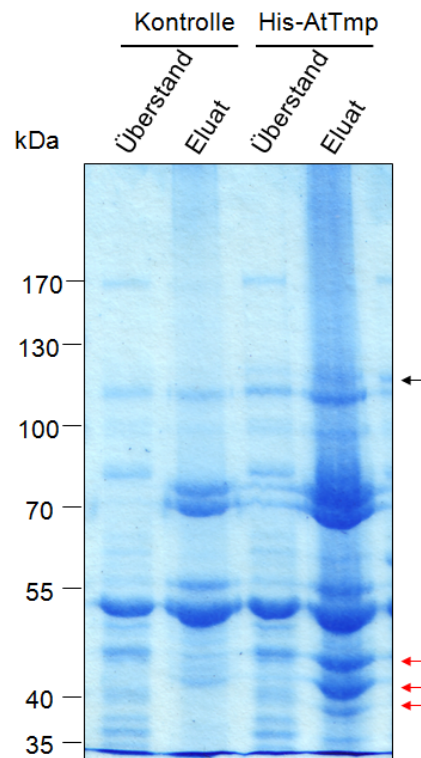


Abb. 35: *Pulldown assays* mit rekombinanter, gereinigter 6xHis-AtRpoTnp und *Arabidopsis* Wildtyp-Stroma. 10 µg der 6xHis-AtRpoTnp (His-AtTnp) bzw. 10 µg Protein der Kontrolllösung (s. 3.3.2.1) wurden mit 100 µl Ni^{2+} -NTA-Agarose (Qiagen) für 3 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 500 µl *Arabidopsis* Wildtyp-Stroma zugegeben. Nach dreimaligem Waschen der Agarose mit Puffer A1 (s. Böhne, 2009) erfolgte die Elution mit 1x Ladepuffer und die Auftrennung der Eluate sowie der Überstände der Versuche im 10 %igen SDS-Gel, welches anschließend mit kolloidalem Coomassie gefärbt wurde. Parallel wurde ein Molekulargewichtsmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) mit aufgetrennt. Die Markerbanden sind gekennzeichnet. Der schwarze Pfeil kennzeichnet 6xHis-AtRpoTnp, welche entsprechend ihrer vorhergesagten Größe (ProtParam) von 107 kDa im Gel migrierte. Rote Pfeile bezeichnen Banden, die im His-At-Tnp-Eluat kräftiger erscheinen als in der Kontrolle.

Die Präzipitation der rekombinanten Polymerase funktionierte. Ihre Identität wurde durch Immunodetektion des 6xHis-tags bestätigt (nicht gezeigt). Jedoch wurde insgesamt nur wenig des 6xHis-markierten Enzyms präzipitiert. Entsprechende Resultate wurden auch für die anderen Polymerasen (6xHis-AtRpoTp, 6xHis-NtRpoTp und –Tnp) erzielt. Die Proteinbandenmuster der Eluate unterschieden sich nicht signifikant. In der Elutionsspur für 6xHis-AtRpoTnp waren kaum zusätzliche Banden gegenüber der Kontrollelution zu erkennen. Lediglich zwischen 40 und 55 kDa waren drei Banden zu erkennen, welche in der His-AtTnp-Spur deutlich kräftiger waren. Jedoch war ebenfalls zu sehen, dass in dieser Spur das Eluat insgesamt konzentrierter als das Kontrolleluat war und daher alle Banden kräftiger erschienen. Des Weiteren konnte in mehreren Versuchen festgestellt werden, dass diese Banden nicht kräftiger waren, sobald Polymerase- und Kontrolleluat durch exakteres Arbeiten nahezu gleich konzentriert waren. Insgesamt konnten mit diesen *pulldown assays* keine interagierenden Proteine bzw. sinnvolle Kandidaten identifiziert werden.

3.2.2.3 Heterologe Expression und Reinigung von GST-At/Nt-RpoTp

Um eine effizientere Präzipitation der rekombinanten RpoTs zu erzielen, wurde als weiterer Affinitäts-tag der GST-tag herangezogen. Die aus den pCold-basierten Expressionsplasmiden amplifizierten Polymerase-Sequenzen wurden in pGEX-2TK kloniert (s. 2.2.13.1). Die Expression der GST-fusionierten RpoTs erfolgte nach IPTG-Induktion bei 18 °C üN und die Reinigung mit Glutathione Sepharose™ 4B im *batch* Verfahren (s. 2.2.10.7.3). Als Kontrolle für die nachfolgenden *pulldown assays* wurde GST durch mit pGEX-2TK transformierte *E. coli* BL21-Zellen heterolog exprimiert und gereinigt. Abbildung 36 zeigt als Beispiel die Expression und Affinitätsreinigung mittels Glutathion Sepharose von GST-AtRpoTp und GST.

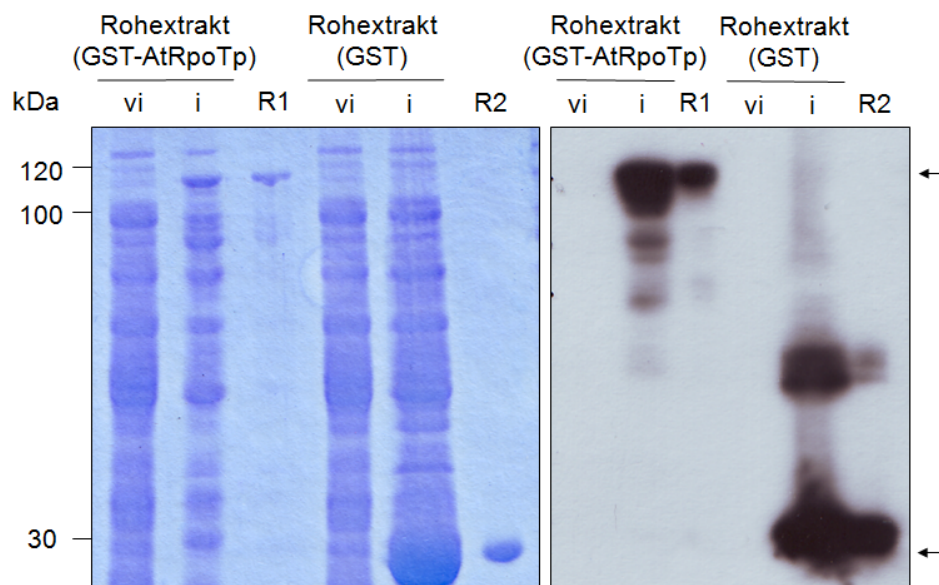


Abb. 36: Expression und Affinitätsreinigung von GST-AtRpoTp und GST. Die Kultivierung von mit pJS19 bzw. pGEX-2TK transformierten *E. coli* BL21-Zellen zur Expression von GST-AtRpoTp und GST erfolgte wie in 2.2.10.7.2 beschrieben. Rohextrakte der Kulturen vor (vi) und nach der Induktion (i) sowie die mittels Affinitätschromatographie mit Glutathione Sepharose™ 4B gereinigten Proteine (R1 = GST-AtRpoTp, R2 = GST) wurden im 10 %igen SDS-Gel parallel zu einem Molekulargewichtsmarker (PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Fermentas) aufgetrennt. Markerbanden sind eingezeichnet. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt (links) bzw. die Proteine wurden mittels *Western Blot* mit Anti-GST Antikörper analysiert (rechts). GST-AtRpoTp und GST sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Die GST-AtRpoTp-Bande und die GST-Bande korrespondierten in ihren Größen mit den vorhergesagten Molekulargewichten (ProtParam;) von 117 kDa bzw. 26 kDa.

In den Reinigungsfraktionen war eine deutliche Anreicherung von GST-AtRpoTp bzw. GST zu erkennen. Die Proteine migrierten entsprechend ihrer zu erwartenden Größe von 117 kDa bzw. 26 kDa (ProtParam, Gasteiger *et al.*, 2005). Die Identität des Fusionsproteins bzw. von GST wurde durch Immunodetektion mit Anti-GST bestätigt.

Da der GST-*tag* im Verhältnis zum 6xHis-*tag* sehr groß ist und Einfluss auf die Funktionalität bzw. Aktivität der jeweils gekoppelten Phagentyp-RNA-Polymerase haben könnte, wurde die unspezifische Transkriptionsaktivität für GST-AtRpoTp im Vergleich zu GST und zur T7-RNA-Polymerase in einem unspezifischen *in vitro* Transkriptionsassay getestet (s. 2.2.12). GST allein zeigte dabei keine Transkriptionsaktivität, wohingegen GST-AtRpoTp transkriptionsaktiv war (nicht gezeigt). Demnach hatte dieser *tag* keinen negativen Einfluss auf die Funktionalität der Fusionsproteine.

3.2.2.4 Pulldown assays mit GST-At/Nt-RpoTp

Die *pulldown assays* mit den GST-Fusionsproteinen wurden im Wesentlichen wie für die 6xHis-fusionierten RpoTs, jedoch mit Glutathion Sepharose durchgeführt (s. 3.2.2.2). Sowohl die jeweilige GST-RpoT als auch das als Kontrolle mitgeführte GST wurden problemlos präzipitiert (nicht gezeigt). Allerdings waren im Vergleich im Eluat des GST-RpoT-Versuchs keine zusätzlichen Banden, die potentielle Interaktionspartner repräsentieren könnten, erkennbar. Der Einsatz von mehr Protein, Stroma, Sepharose oder auch andere Inkubationszeiten änderten dieses Resultat nicht. Da sowohl die *pulldown assays* mit den GST-markierten RpoTs aus *Arabidopsis* und Tabak also auch die *in vivo* Expression Epitop-markierter Tabak-RpoTp nicht zur Identifikation potentieller Interaktionspartner führte, wurde als weiterer Ansatz die *in vivo* Expression Epitop-markierter *Arabidopsis* RpoTs zur Immunopräzipitation und Co-Präzipitation potentieller Interaktionspartner gewählt.

3.2.3 In vivo Expression Epitop-markierter RpoTs in *A. thaliana*

Für die Klonierung der zur Transformation von *Arabidopsis* Wildtyppflanzen verwendeten Vektoren wurden durch Dr. Karsten Liere (HU Berlin) die aus cDNA amplifizierten RpoT-Sequenzen in pBluescript ligiert. Dabei wurde für die spätere Insertion der Epitop-Sequenzen eine Schnittstelle zwischen der das Transitpeptid kodierenden Sequenz und der Sequenz für das funktionale Enzym eingeführt. Diese Plasmide (pKL215, pKL216 und pKL217; s. 2.1.4 Tab. 2) wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Um für die spätere Immunopräzipitation geeignete Epitope auswählen zu können, wurden mit Chloroplastenextrakten des *Arabidopsis* Wildtyps mit unterschiedlichen Epitop-spezifischen Antikörpern *Western Blot* Analysen durchgeführt und die Antikörper auf Kreuzreaktionen mit *Arabidopsis* Proteinen getestet. Von den untersuchten Antikörpern (Anti-FLAG, Anti-HA, Anti-cMyc, Anti-E2 und Anti-StrepII) zeigten Anti-FLAG und Anti-HA die wenigsten Kreuzreaktionen insbesondere mit RbcL (nicht gezeigt). Als Epitop-Markierung wurden daher eine Kombination aus FLAG-HA-*tag* (FLAG Peptid DYKDDDDK, Einhauer und

Jungbauer, 2001; Hämagglutinin AS 98-106 YPYDVPDYA, Wilson *et al.*, 1984), ein 3xFLAG-tag und ein 3xHA-tag gewählt. Die entsprechenden Sequenzen wurden in pKL215/pKL216/pKL217 ligiert und das gesamte Epitop-Polymerase-Konstrukt in pKL218 (pBI121ΔGUS; s. 2.1.4, Tab. 2) kloniert, um die Transformationsvektoren pJS10 bis pJS18 (s. Tab. 2) zu erhalten. Durch Agrobakterien-vermittelte Transformation wurden die rekombinanten Polymerase-Sequenzen stabil an zufälligen Orten des Kerngenoms inseriert. Die originalen RpoT-Sequenzen blieben dabei erhalten. Die konstitutive Expression von 3xFLAG-/ 3xHA-/ FLAG-HA-RpoTp/mp/m erfolgte vom 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus aus.

3.2.3.1 Identifizierung transgener Linien durch PCR

Die Samen der transformierten Pflanzen wurden auf MS_{Kan/Carb} unter Standardbedingungen angezogen (s. 2.2.3). Alle Transformanten der transgenen Linien (s. 2.1.2, Tab. 1), die nachfolgend kurz als FLAG-HA-Tp/mp/m, 3xFLAG-Tp/mp/m und 3xHA-Tp/mp/m bezeichnet werden, wurden durch PCRs mit Polymerase- und tag-spezifischen Oligonukleotiden auf die Insertion der erwünschten Sequenzen getestet (Abb. 37). Das Schema in Abb. 37A verdeutlicht, dass für jede transgene Linie untersucht wurde, ob die erwünschte Polymerase-Sequenz in Kombination mit der erwünschten Epitop-Sequenz ins Genom integriert wurde. Dabei wurden in der PCR (s. Abb. 37B und C) mit den beiden tag-spezifischen *primern* und dem jeweiligen Polymerase-spezifischen *primer* im Falle des FLAG-HA-tags zwei Banden detektiert. Für die Varianten mit 3xFLAG- bzw. 3xHA-tag wurde jeweils nur eine Bande beobachtet, obwohl die tag-spezifischen Oligonukleotide theoretisch an drei Positionen im tag hybridisieren können. Jedoch betrug der dadurch zu erwartende Größenunterschied der PCR-Produkte nur ca. 20 Nukleotide, was im 2 %igen Agarosegel nicht aufgelöst wurde. Die Wildtypkontrolle war erwartungsgemäß negativ. Mit den Polymerase-spezifischen Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotiden wurde im Wildtyp eine Bande um 690/ 730/ 630 bp (RpoTp/ Tmp/ Tm) detektiert. In den transgenen Linien wurden zwei Signale erhalten, wobei die um ca. 80/ 90/ 60 bp (3xFLAG/ 3xHA/ FLAG-HA) größere Bande die Epitop-markierte RpoT repräsentierte und die untere Bande auf die wildtypische Sequenz zurückzuführen war. Die Verwendung des zweiten Polymerase-spezifischen Rückwärts-*primers* (Abb. 37A, *primer* 5), welcher teilweise mit der C-terminal konservierten RpoT-Sequenz und teilweise mit der Vektorsequenz hybridisierte, diente der Überprüfung der Vollständigkeit der integrierten RpoT-Sequenz (Abb. 37C).

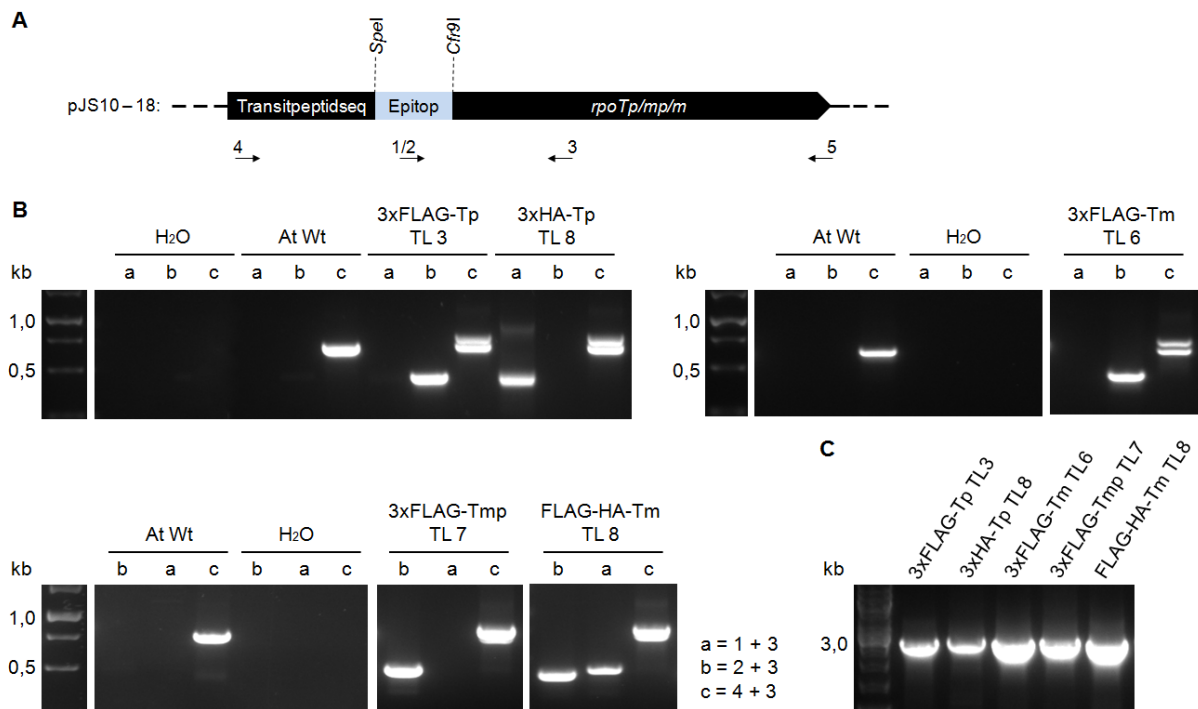


Abb. 37: PCR-Analysen der potentiellen, transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen zur Überprüfung der Insertion der korrekten Polymerase-Sequenzen inklusive Epitop-Sequenzen. **A** Prinzip der PCR-Analysen mit Positionen der tag-spezifischen und Polymerase-spezifischen Oligonukleotide (s. Tab. A1). 1 = HA-spezifischer *primer* (K-HA), 2 = FLAG-spezifischer *primer* (K-FLA₃SacII), 3 = Polymerase-spezifischer Rückwärts-*primer* (K-AtTp_{rev}-s, K-AtTm_{rev}-s, K-AtTm_{rev}-s), 4 = Polymerase-spezifischer Vorwärts-*primer* (K-AtTp_{fw}-fw, K-AtTm_{fw}-fw, K-AtTm_{fw}-fw), 5 = *primer*, der teilweise im C-Terminus und teilweise in der Vektorsequenz hybridisiert (K-AtRpoT_{rev}-I; spezifisch für alle drei Polymerasen); pJS10-18 = ursprüngliche Transformationsvektoren (s. 2.1.4, Tab. 2), Transitpeptidseq = Sequenz, die für das vorhergesagte Transitpeptid kodiert. **B** Es wurde Gesamt-DNA der transgenen Linien und des Wildtyps (At Wt) extrahiert und je 100 ng DNA wurden für die PCRs mit einer *Annealing*-Temperatur von 60 °C und Elongationszeiten von 1-3 min eingesetzt. Es wurde jeweils eine Wasserkontrolle (H₂O) mitgeführt. a, b und c kennzeichnen verschiedene *primer*-Kombinationen wie in der Legende angegeben. Die PCR-Produkte wurden im 2 %igen Agarosegel parallel zu einem Größenstandard (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas) aufgetrennt. TL = transgene Linie. **C** PCRs zur Überprüfung der Vollständigkeit der integrierten Sequenzen mit der *primer*-Kombination 1/ 2 + 5. Die PCR-Produkte wurden parallel zu einem DNA-Marker (GeneRuler™ 1 kb Ladder, Fermentas) im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt.

Durch dieses Durchmustern konnte eine Vielzahl positiver transgener Linien identifiziert werden.

3.2.3.2 Proteinexpression in den transgenen Linien

Gesamtprotein-Präparationen (s. 2.2.10.1) der PCR-positiven Linien wurden durch *Western Blot* (s. 2.2.10.4) mit FLAG- bzw. HA-spezifischem Antikörper auf die Expression der jeweiligen Epitop-markierten Phagentyp-RNA-Polymerase hin untersucht. Abbildung 38A zeigt beispielhaft *Western Blots* für einige Linien, in denen mit Anti-FLAG bzw. Anti-HA die jeweilige, rekombinante RpoT detektiert werden konnte.

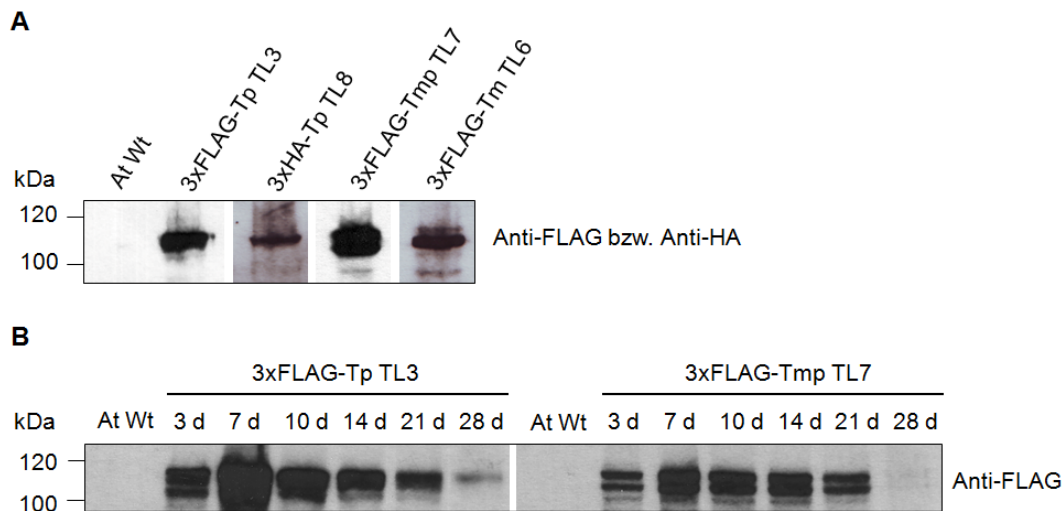


Abb. 38: *Western Blot*-Analyse der Expression der Epitop-markierten RpoTs in ausgewählten transgenen Linien. Es wurde Gesamt-Protein präpariert und 30 µg (Tp- und Tm-exprimierende Linien) bzw. 50 µg (3xFLAG-Tmp TL7) im 7,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit Anti-FLAG bzw. Anti-HA Antikörper analysiert. Parallel wurde ein Größenstandard (PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Fermentas) im Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Marker-Banden sind in kDa gekennzeichnet. TL = transgene Linie. d = Tage nach Aussaat. **A** Die transgenen Linien wurden unter Standardbedingungen auf MS_{Kan}-Medium angezogen, sowie der Wildtyp (At Wt) auf MS-Medium. Von 21 d alten Pflanzen wurde Protein für die Immunodetektion mit Anti-FLAG bzw. Anti-HA (Spur 3, 3xHA-Tp TL8) Antikörper präpariert. **B** Die transgenen Linien wurden auf Erde angezogen. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung wurden Proben für die Proteinpräparation und den anschließenden *Western Blot* mit Anti-FLAG Antikörper genommen.

Die mit Anti-FLAG bzw. Anti-HA detektierten RpoT-Banden (Abb. 38A) migrierten erwartungsgemäß zwischen 100 und 120 kDa, was mit den durch ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>; Gasteiger *et al.*, 2005) vorhergesagten Größen von 105 kDa für 3xFLAG-RpoTp, 105 kDa für 3xHA-RpoTp, 110 kDa für 3xFLAG-RpoTmp und 106 kDa für 3xFLAG-RpoTm korrespondierte. Für alle weiteren Versuche wurden von den transgenen Linien 3xFLAG-Tp TL3 und TL6, 3xFLAG-Tmp TL7 und 3xFLAG-Tm TL3, TL6 und TL7 Samen produziert, da diese sowohl in der PCR positiv waren als auch eine gute Proteinexpression der jeweiligen Epitop-markierten RpoT zeigten. Allerdings war die Expression in den RpoTp-exprimierenden Linien stets deutlich stärker als in allen RpoTmp-exprimierenden Linien. Bei Auftrag gleicher Proteinmengen betrug die Expression von 3xFLAG-RpoTmp ca. 30-50 % der 3xFLAG-RpoTp-Expression. Für 3xFLAG-Tmp mussten daher 20 µg mehr Protein im SDS-Gel aufgetrennt werden um kräftige Signale im *Western Blot* zu erhalten. Im Weiteren wurden vor allem die Linien 3xFLAG-Tp TL3 und 3xFLAG-Tmp TL7 verwendet. Mit den Epitop-RpoTm exprimierenden Pflanzen wurden aus Zeitgründen und, da die Isolation von Mitochondrien aufwendiger als die Chloroplastenisolation ist, nur wenige Versuche durchgeführt.

Anschließend wurde untersucht, zu welchem Zeitpunkt der Chloroplastenentwicklung die Expression der *getaggtten* Polymerasen am stärksten ist. Zwar erfolgte die Expression vom 35S-Promotor aus konstitutiv, dennoch sollte überprüft werden, ob entwicklungsabhängige Unterschiede vorliegen, die bei der Wahl der Anzuchtzeit für Versuche zu berücksichtigen wären. Dazu wurden die transgenen Linien 3xFLAG-Tp TL3, 3xFLAG-Tmp TL7 und 3xFLAG-Tm TL7 auf MS_{Kan}-Medium angezogen, zu unterschiedlichen Zeiten nach Aussaat wurden Proben für die Gesamtprotein-Präparation genommen (s. 2.2.10.1) und die Proteinexpression mittels *Western Blot* analysiert. Trotz der konstitutiven Überexpression ist in Abbildung 38B deutlich zu erkennen, dass die Proteinexpression in 3xFLAG-Tp TL3 und 3xFLAG-Tmp TL7 7 d nach Aussaat am stärksten war. Auch nach 14 d konnte noch eine gute Expression beobachtet werden. Ein entsprechendes Ergebnis wurde für 3xFLAG-Tm TL7 erhalten (nicht gezeigt). Daraus resultierend wurden nachfolgende Versuche hauptsächlich mit 7-14 d alten Pflanzen durchgeführt. Es ist außerdem zu erkennen, dass für 3xFLAG-RpoTmp zu allen Zeitpunkten und für 3xFLAG-RpoTp von 3-10 d zwei Banden durch Anti-FLAG detektiert wurden. Vermutlich handelte es sich bei der oberen Bande um die Epitop-markierte Polymerase und bei der unteren um ein Abbauprodukt, welches beispielsweise aus einem teilweisen Abbau des *tags* oder der wenigen AS vor dem Epitop resultieren könnte.

3.2.3.3 Funktionalität der Epitop-markierten, *in vivo* exprimierten AtRpoTs

Da für eine erfolgreiche Co-Präzipitation potentieller Interaktionspartner die jeweilige Epitop-fusionierte Polymerase vollständig und korrekt gefaltet sein muss, wurde die Funktionalität mittels *primer extension* Analyse (s. 2.2.9.17) überprüft. Weil der 35S-Promotor eine konstitutive Überexpression vermittelt, sollte eine verstärkte Nutzung von NEP-Promotoren zu beobachten sein. Daher wurden unterschiedliche NEP-Promotoren auf ihre Nutzung im Vergleich zum Wildtyp hin in den transgenen Pflanzen untersucht. Abbildung 39 zeigt das Resultat dieser Analysen für 3xFLAG-Tp TL3 und 3xFLAG-Tmp TL7. Für die NEP-Promotoren *PaccD*-172, *PatpB*-318 und *PclpP*-58 konnte in der transgenen Linie 3xFLAG-Tp TL3 eine verstärkte Promotornutzung beobachtet werden. Dasselbe Ergebnis wurde auch für 3xFLAG-Tp TL6 erhalten sowie für die Nutzung von *PrpoB*-300 (nicht gezeigt). Dies zeigte, dass die 3xFLAG-fusionierte RpoTp tatsächlich überexprimiert wurde und funktionell, also höchstwahrscheinlich korrekt gefaltet war. In transgenen Tabakpflanzen, die RpoTp überexprimierten, wurde lediglich für Typ-I NEP-Promotoren eine verstärkte Promotornutzung beobachtet (Liere *et al.*, 2004). Daraus wurde geschlussfolgert, dass eine zweite NEP-Aktivität wie RpoTmp für die Transkriptionsinitiation am *non-consensus*

Promotor von *clpP* verantwortlich sein könnte. Die *primer extension* Analysen der vorliegenden Arbeit deuteten jedoch darauf hin, dass RpoTp sowohl Typ-I NEP-Promotoren als auch den Typ-II NEP-Promotor *PclpP*-58 spezifisch erkennen kann. Dies korreliert mit Daten von Courtois *et al.* (2007), die ebenfalls auf eine Promotorerkennung durch RpoTp schließen ließen.

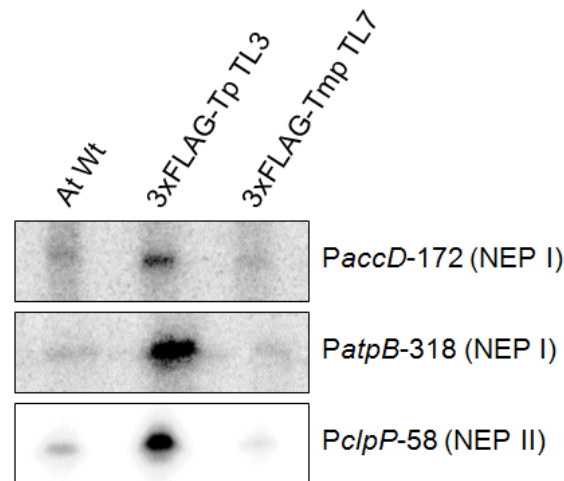


Abb. 39: *Primer extension* Analysen von NEP-Promotoren für 3xFLAG-Tp TL3 und 3xFLAG-Tmp TL7. Die transgenen Pflanzen und der Wildtyp (At Wt) wurden unter Standardbedingungen angezogen. 14 d nach Aussaat wurde RNA extrahiert. 15 µg RNA wurden für die Reaktion mit spezifischen Oligonukleotiden für *accD*, *atpB* bzw. *clpP* (s. 2.2.9.17, Tab. 5) eingesetzt und die Produkte auf einem 4 %igen Sequenzgel aufgetrennt. Die Lokalisation der Transkriptionsstartstellen erfolgte anhand der mit aufgetrennten Sequenzreaktionen, die mit den Plasmiden pMS2b, pMS3b bzw. pMS5b (für *atpB*, *clpP* bzw. *accD*; s. 2.1.4, Tab. 2.) durchgeführt wurden (nicht gezeigt). Die detektierten Promotoren sind gekennzeichnet.

Die Signale in 3xFLAG-Tmp TL7 entsprachen den wildtypischen Signalen. Dies muss nicht bedeuten, dass die Tertiärstruktur von 3xFLAG-RpoTmp nicht korrekt war und das Enzym keine Aktivität besaß. Möglicherweise ist dieses Resultat darauf zurückzuführen, dass die Polymerase-Expression in 3xFLAG-Tmp insgesamt deutlich geringer war als in 3xFLAG-Tp (s. 3.2.3.2). Zwar wurde 3xFLAG-RpoTmp exprimiert, doch trotz der Transkription vom 35S-Promotor aus war die Abundanz der Polymerase relativ gering, weshalb vermutlich kaum Auswirkungen auf RNA-Ebene beobachtet werden konnten. Außerdem stellt RpoTp diejenige Polymerase dar, die hauptsächlich für die Transkription NEP-kontrollierter Gene zuständig ist, während RpoTmp in den Plastiden möglicherweise vor allem die Transkription des *rrn*-Operons in frühen Entwicklungsstadien bewerkstelligt (Courtois *et al.*, 2007). In *primer extension* Analysen mit *rrn16*-spezifischen Oligonukleotiden konnte jedoch auch keine verstärkte Nutzung des NEP-Promotors *Prrn16*-139 (Pc-Promotor) in 3xFLAG-Tmp gegenüber dem Wildtyp beobachtet werden (nicht gezeigt).

Für die Epitop-Tm-exprimierenden Pflanzen wurden bislang keine *primer extension* Analysen durchgeführt.

3.2.3.4 Die RpoT-Überexpression wirkt sich auf RNA-Ebene, nicht jedoch auf Proteinebene aus

Eine Überexpression der plastidenlokalisierten RpoTs kann Auswirkungen auf die Transkriptmengen NEP-transkribierter Gene haben. Auf von PEP transkribierte Gene sollte die *getaggte* Polymerase hingegen keinen bzw. einen indirekten Einfluss über die verstärkte Transkription des *rpoB/C1/C2* Operons haben. Für die Untersuchung der *steady state* Transkriptmengen für einige ausgewählte NEP- und PEP-transkribierte Gene in den transgenen Pflanzen 3xFLAG-Tp TL3 und 3xFLAG-Tmp TL7 wurde RNA von 14 d alten Pflanzen bzw. von Pflanzen unterschiedlichen Alters präpariert (s. 2.2.9.7) und im *Northern Blot* analysiert (s. 2.2.9.13). Abbildung 40 zeigt die Signale der mit den verschiedenen DNA-Sonden detektierten mRNAs.

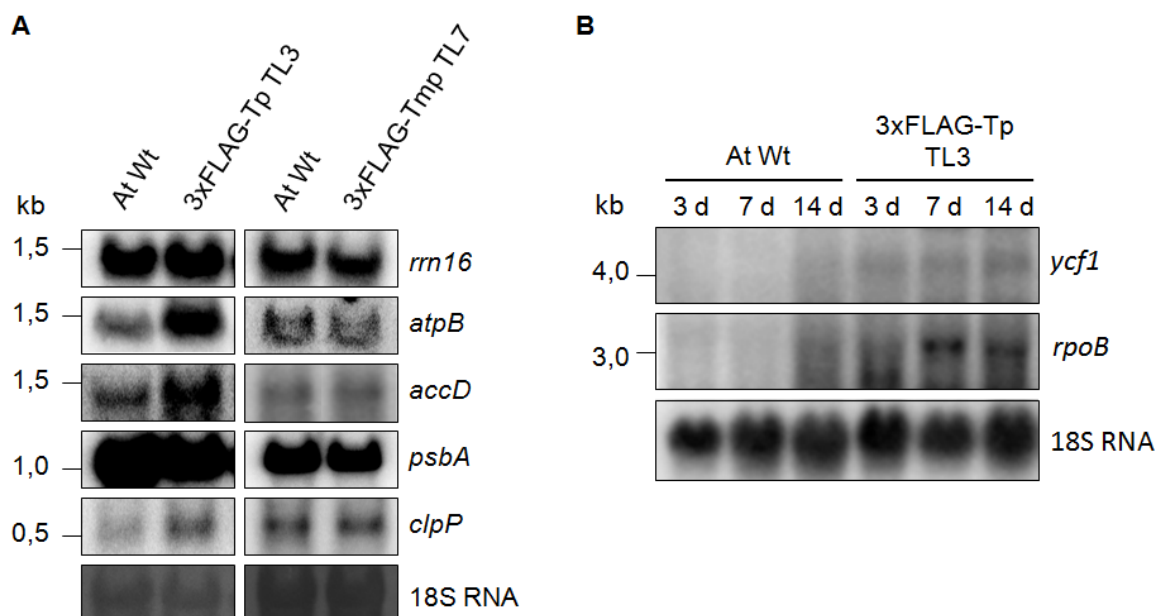


Abb. 40: *Northern Blot* Analysen unterschiedlicher Gene, die von PEP, NEP oder beiden Polymerasen transkribiert werden, in den transgenen Linien 3xFLAG-Tp TL3 und 3xFLAG-Tmp TL7. 10 µg RNA der transgenen Linien und des Wildtyps (At Wt) wurden im 0,8 %igen Agarosegel parallel zu einem Größenstandard (RiboRuler™ RNA Ladder High Range, Fermentas) aufgetrennt und nach Transfer auf Nylonmembranen mit genspezifischen DNA-Sonden hybridisiert. Die Markerbanden sind in kb gekennzeichnet. Zur Beladungskontrolle wurde 18S RNA detektiert. **A** Analyse verschiedener NEP- und PEP-abhängiger mRNAs in 14 d altem Wildtyp und 3xFLAG-Tp sowie 3xFLAG-Tmp. **B** Analyse der NEP-Transkripte von *ycf1* und *rpoB* in 3xFLAG-Tp und Wildtyp zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Aussaat (d).

Für das durch PEP transkribierte Gen *psbA* (Abb. 40A) waren jeweils keine Unterschiede in den Signalintensitäten zwischen transgener Linie und Wildtyp zu erkennen. Die Gene *atpB*, *clpP*, *ycf1* und *rrn16* besitzen sowohl NEP- als auch PEP-Promotoren. Die Gene *accD* und *rpoB* werden ausschließlich durch NEP transkribiert. Für *atpB*, *accD* und *clpP* (Abb. 40A), sowie *rpoB* und *ycf1* (Abb. 40B) war in 3xFLAG-Tp eine Erhöhung der Transkriptmenge zu

beobachten. Die verstärkte Promotornutzung führte für diese Gene also zu höheren Transkriptmengen. Dieser Effekt konnte für *rpoB* und *ycfI* ab 7 d nach Aussaat beobachtet werden (s. Abb. 40B). Für 3xFLAG-Tmp konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden. Zum einen konnte dies wiederum darauf zurückgeführt werden, dass RpoTp und nicht RpoTmp diejenige Polymerase darstellt, die die Hauptarbeit bei der Transkription NEP-transkribierter Gene leistet (Courtois *et al.*, 2007). Des Weiteren wäre eine Erhöhung der Transkriptlevel gegebenenfalls für *rrn16* zu erwarten, da RpoTmp das *rrn* Operon in frühen Entwicklungsstadien vom Pc-Promotor aus transkribierte (Courtois *et al.*, 2007). Zwar wurde eine starke Aktivität von RpoTmp bei der Transkription des *rrn* Operons nur während der Keimung beobachtet und in Kotyledonen und Blättern konnten keine oder wenig Pc-initiierte Transkripte nachgewiesen werden (Sriraman *et al.*, 1998a; Bisanz *et al.*, 2003; Zoschke *et al.*, 2007), jedoch könnte eine konstitutive Überexpression von RpoTmp zu einer Erhöhung der *rrn16* Transkriptmenge auch bei 14 d alten Pflanzen führen. Dass dies jedoch nicht der Fall war (s. Abb. 40A) und auch in *Northern Blots* mit 7 d alten Pflanzen nicht beobachtet wurde (nicht gezeigt), war möglicherweise wieder auf die relativ geringe Expression und Abundanz der *getaggen* RpoTmp zurückzuführen.

Durch *Western Blot* sollte nun analysiert werden, ob die Veränderungen auf RNA-Ebene auch auf Protein-Ebene widerspiegelt werden. Von 14 d alten Pflanzen wurde Protein präpariert und 50 µg im 7,5 bzw. 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Die gleichmäßige Beladung wurde durch Ponceau-Färbung anhand von RbcL überprüft (Abb. 41). Obwohl die Transkriptmengen von *atpB* und *rpoB* in 3xFLAG-Tp erhöht waren, war kein Unterschied auf Proteinebene zwischen Wildtyp und transgenen Linien erkennbar. Eine Überexpression von NEP führte definitiv nicht zu einer erhöhten Menge von PEP (s. RpoB und RpoA). Dementsprechend war auch kein Einfluss auf das Proteinlevel des D1-Proteins, kodiert durch das PEP-transkribierte Gen *psbA*, zu sehen. Die erhöhten Transkriptmengen wurden wahrscheinlich durch posttranskriptionale und posttranslationale Regulation ausgeglichen.

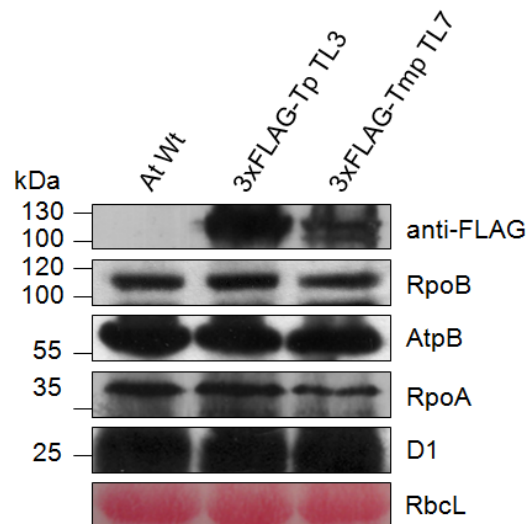


Abb. 41: *Western Blot* Analyse verschiedener Proteine in den transgenen Linien 3xFLAG-Tp TL3 und 3xFLAG-Tmp TL7. 50 µg Protein der transgenen Pflanzen und des Wildtyps (At Wt) wurden im 7,5 %igen SDS-Gel parallel zu einem Molekulargewichtsmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) aufgetrennt und auf Nylonmembranen transferiert. Die Markerbanden sind in kDa gekennzeichnet. Mit spezifischen Antikörpern wurden die Epitop-markierten Phagentyp-Polymerasen sowie die PEP-Untereinheiten RpoA und RpoB, das von *psbA* kodierte D1-Protein und AtpB detektiert. Zur Beladungs- und Qualitätskontrolle wurden die Membranen mit Ponceau gefärbt und die RbcL-Banden verglichen.

3.2.3.5 Phänotyp der transgenen Pflanzen unter Standardbedingungen

Die transgenen Linien 3xFLAG-Tp TL3 und 3xFLAG-Tmp TL7 wurden vergleichend mit dem *Arabidopsis* Wildtyp auf Erde unter Standardbedingungen angezogen (Abb. 42). Dabei waren keine Unterschiede zwischen Wildtyp und transgenen Linien zu erkennen (Abb. 42A). Des Weiteren wurden die transgenen Pflanzen entsprechend der kodierten Resistenz auf MS_{Kan}-Medium angezogen. Der Wildtyp wurde sowohl auf MS_{Kan} als auch für den weiteren Vergleich auf MS-Medium ohne Antibiotikum ausgesät. Auf Kanamycin-haltigem Medium entwickelte der Wildtyp erwartungsgemäß nur gebleichte Kotyledonen (Abb. 42B, 7d At Wt rechte Hälfte). Die transgenen Linien dagegen entwickelten grüne Kotyledonen und Blätter. Verglichen mit dem auf MS angezogenen Wildtyp zeigte 3xFLAG-Tp manchmal eine leichte Verzögerung der Entwicklung, wobei die Keimlinge etwas kleiner waren und die Kotyledonen und ersten beiden Rosettenblätter nach ca. 7-10 d die Wildtyp-Größe erreichten. Bei 3xFLAG-Tmp war diese Verzögerung etwas stärker ausgeprägt. Zu einem geringen Anteil waren die ersten Blätter anfangs gelblich mit fransigem Rand. Diese Entwicklungsverzögerung ging vermutlich teilweise auf den Selektionsdruck zurück. Im Laufe der weiteren Entwicklung und nach Umsetzen auf Erde verschwand der Größen- und Entwicklungsunterschied. 14 d nach Aussaat waren keine signifikanten Unterschiede mehr erkennbar. Auch bei der Blühinduktion wurden keine Unterschiede zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp beobachtet.

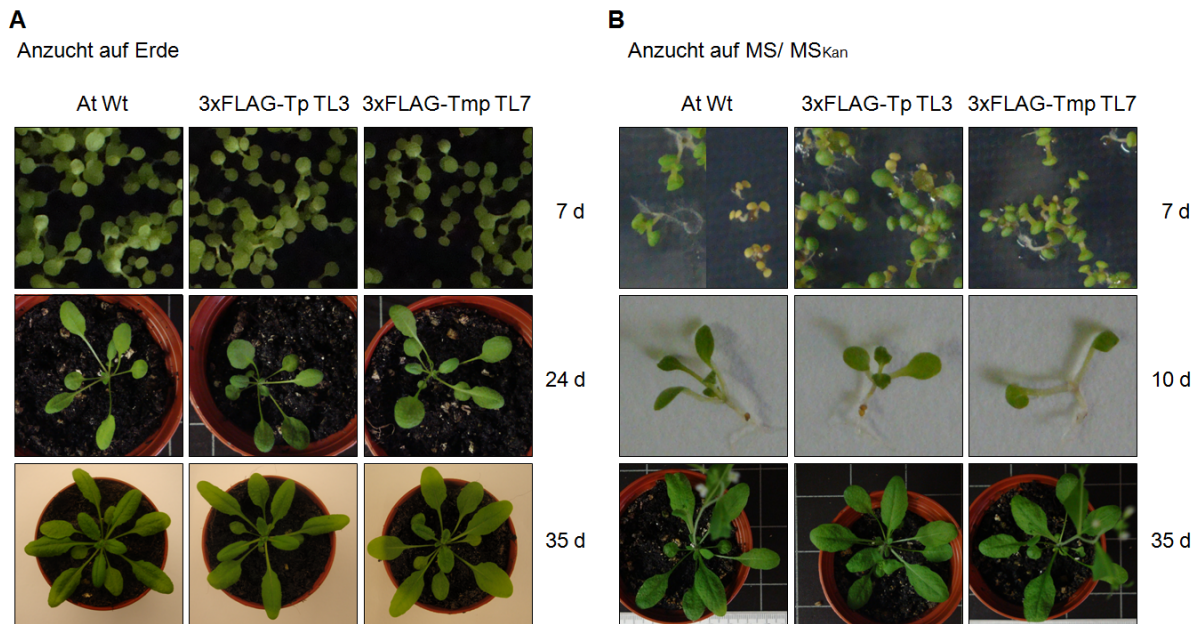


Abb. 42: Makroskopischer Phänotyp der transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen 3xFLAG-Tp TL3 und 3xFLAG-Tmp TL7. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aussaat (d) der transgenen Pflanzen und des Wildtyps (At Wt) wurde das Wachstum verglichen und dokumentiert. **A** Die Pflanzen wurden auf Erde gesät und nach 7 d vereinzelt. **B** Die transgenen Pflanzen wurden auf Kanamycin-haltigem MS-Medium gesät und nach 10 d auf Erde übertragen. Der Wildtyp wurde ebenfalls auf MS_{Kan} (7d rechts) sowie auf MS-Medium ohne Antibiotikum (7d links) angezogen. Nur die auf MS-Medium gewachsenen Keimlinge wurden nach 10 d zum weiteren Vergleich auf Erde transferiert.

3.2.3.6 3xFLAG-Tp ist kältesensitiv

Bei Anzucht auf Medium mit Spectinomycin, welches die plastidäre Proteinsynthese blockiert und so zur starken Reduktion von PEP führt (Swiatecka-Hagenbruch *et al.*, 2008), sowie unter Trocken- und Salzstress (MS-Medium mit 300 mM NaCl) konnte für die transgenen, NEP-überexprimierenden Pflanzen kein Wachstumsvorteil gegenüber dem Wildtyp beobachtet werden. Unter Kältestress jedoch war ein Effekt für 3xFLAG-Tp zu sehen. Abbildung 43 zeigt Bilder von Pflanzen, welche zunächst unter Standardbedingungen auf Erde oder MS (Wildtyp) bzw. MS_{Kan} (transgene Linien) angezogen, 14 d nach Aussaat vereinzelt und anschließend 17 d Tage nach Aussaat für 14 d bei 8 °C wachsen gelassen wurden. Der Wildtyp sowie 3xFLAG-Tmp TL7 wuchsen zwar deutlich langsamer als unter Normalbedingungen, dennoch waren die Blätter grün (Abb. 43A). Bei 3xFLAG-Tp TL3 und TL6 (Abb. 43A und B) dagegen blichen die Blätter aus. Dieser Effekt war am stärksten bei den jeweils jüngsten Rosettenblättern zu erkennen.

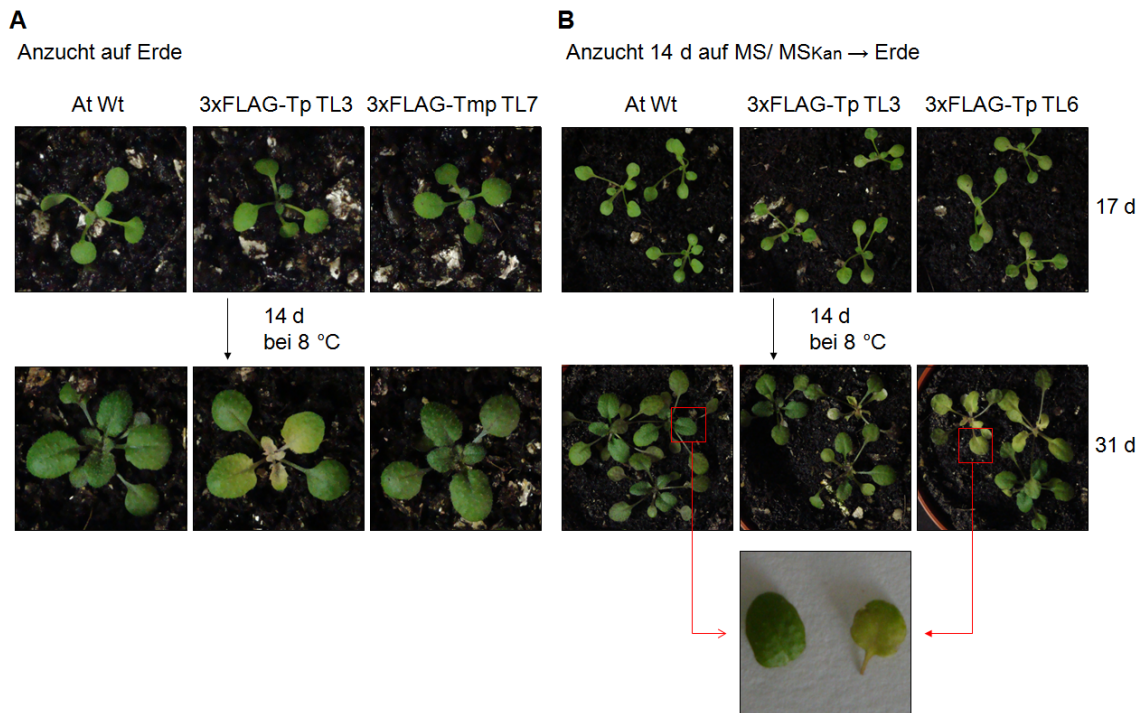


Abb. 43: Phänotyp der transgenen Pflanzen 3xFLAG-Tp TL3 und TL6 sowie 3xFLAG-Tmp TL7 bei Kältestress. Die transgenen Pflanzen und der Wildtyp (At Wt) wurden 14 d nach Aussaat vereinzelt und auf Erde transferiert. Drei Tage später wurden die Pflanzen bei 8 °C für 14 d wachsen gelassen und anschließend verglichen und fotografiert. **A** 3xFLAG-Tp TL3, 3xFLAG-Tmp TL7 und der Wildtyp wurden auf Erde gesät und vereinzelt. **B** 3xFLAG-Tp TL3 und TL6 wurden auf MS_{Kan}-Medium sowie der Wildtyp auf MS-Medium gesät und dann auf Erde übertragen.

Das Ausbleichen der Blätter deutete auf einen Abbau der Thylakoidmembran und der Photosynthesekomplexe hin. Um zu untersuchen, ob dies auf Veränderungen von Transkriptionsaktivitäten zurückzuführen war, wurde von den grünen Wildtyp-Blättern und den gebleichten Blättern der Linie 3xFLAG-Tp TL6 (s. Abb. 43B, Ausschnitt) RNA präpariert und mittels *Northern Blot* mit Sonden für PEP- und NEP-transkribierte Gene analysiert (s. Abb. 44). Für die beiden durch NEP transkribierten Gene *clpP* und *accD* waren keine signifikanten Unterschiede der Transkriptlevel zwischen Wildtyp und den RpoTp-Überexpressoren zu sehen. Für die durch PEP transkribierten Gene *psbA* und *rbcL* konnte dagegen eine leichte Verringerung der Transkriptmenge in den transgenen Linien beobachtet werden. Dies lässt auf eine Veränderung der Transkriptionsaktivität von PEP und auch von RpoTp schließen, da unter Standardbedingungen die Transkriptlevel von *accD* und *clpP* gegenüber dem Wildtyp leicht erhöht waren.

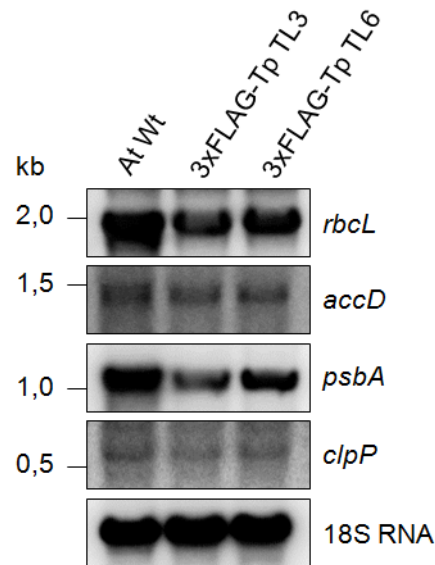


Abb. 44: Northern Blot Analyse der transgenen Linien 3xFLAG-Tp TL3 und TL6 nach Kältestress. 10 µg RNA der transgenen Pflanzen und des Wildtyps (At Wt) wurden im 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembranen transferiert. Parallel wurde ein Größenstandard (RiboRuler™ RNA Ladder High Range, Fermentas) aufgetrennt. Die Markerbanden sind in kb gekennzeichnet. Die Membranen wurden mit genspezifischen Sonden für die NEP-Transkripte *accD* und *clpP* sowie für die PEP-Transkripte *rbcL* und *psbA* hybridisiert. Zur Beladungskontrolle erfolgte die Detektion der 18S RNA.

Da die Kälte-Versuche erst zum Ende der Doktorarbeit durchgeführt wurden, konnte aus Zeitgründen keine weitere Versuchsreihe durchgeführt und Proben für einen *Western Blot* zur vergleichenden Untersuchung der Proteinmengen von RpoTp und PEP-Untereinheiten genommen werden.

3.2.3.7 Organelläre und subplastidäre Lokalisation von RpoTp und RpoTmp

Die Lokalisation von RpoTp in den Plastiden ist unbestritten und wurde für *Arabidopsis* z.B. durch GFP-Fusion gezeigt (Hedtker *et al.*, 1999). Die duale Lokalisation von RpoTmp in Chloroplasten und Mitochondrien wird noch immer diskutiert. Zudem wurde für Spinat gezeigt, dass sowohl RpoTp als auch RpoTmp vollständig membranassoziiert, also an Thylakoid- und Hüllmembran gebunden sind (Azevedo *et al.*, 2006). Nachfolgend sollte daher die organelläre und sub-plastidäre Lokalisation der *getaggt*en RpoTp und RpoTmp untersucht werden, da dies für eine Co-Präzipitation von interagierenden Proteinen relevant ist. Von den 21 d alten, transgenen Pflanzen 3xFLAG-Tp TL3 und 3xFLAG-Tmp TL7 wurden Chloroplasten isoliert und Stroma und Membranfraktion präpariert. Von 3xFLAG-Tmp TL7 wurden außerdem Mitochondrien isoliert und lysiert. Chloroplastenpellet und Mitochondrienpellet wurden im selben Volumen Lysepuffer aufgeschlossen. Die Membranpellets wurden nach Waschen im halben Lysevolumen resuspendiert. Für den

Western Blot wurden gleiche Volumina der Präparationen im SDS-Gel aufgetrennt (Abb. 45A).

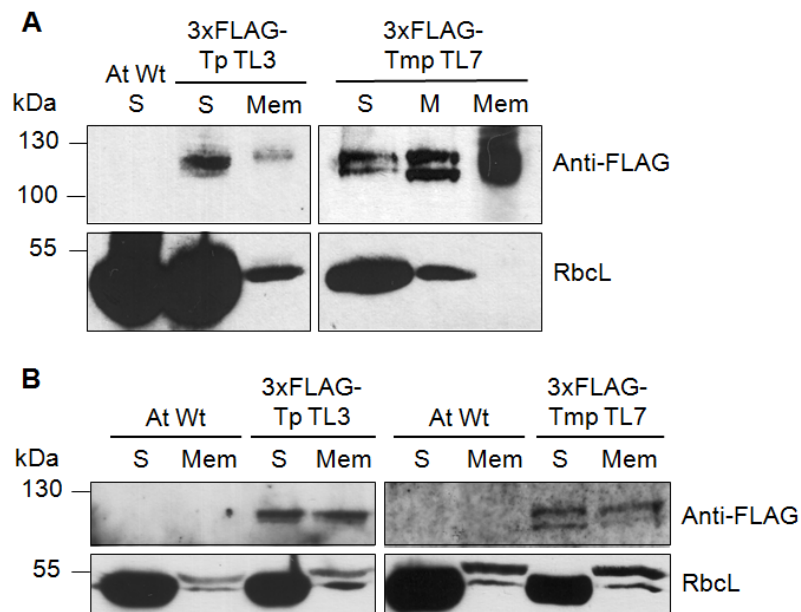


Abb. 45: *Western Blot* Analysen zur Untersuchung der Lokalisation der 3xFLAG-fusionierten RpoTp und RpoTnp. **A** Isolierte Chloroplasten von 21 d altem Wildtyp (At Wt), 3xFLAG-Tp TL3 und 3xFLAG-Tnp TL7 wurden lysiert und die Membranfraktion nach mehreren Waschschritten im halben Lysevolumen resuspendiert. Isolierte Mitochondrien von 3xFLAG-Tnp TL7 wurden im selben Volumen Lysepuffer aufgeschlossen wie die Chloroplasten. Im 7,5 %igen SDS-Gel wurden parallel zu einem Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) je 20 µl von Stroma (S), Mitochondrienextrakt (M) und Membranfraktionen (Mem) elektrophoretisch aufgetrennt und im *Western Blot* mit Anti-FLAG und Anti-RbcL Antikörper analysiert. Die Markerbanden sind in kDa gekennzeichnet. **B** Von 14 d altem Wildtyp, 3xFLAG-Tp TL3 und 3xFLAG-Tnp TL7 isolierte Chloroplasten wurden lysiert und die Membranfraktion nach mehreren Waschschritten im ursprünglichen Lysevolumen resuspendiert. Je 20 µl von Stroma (S) und Membranfraktion (Mem) wurden im 7,5 %igen SDS-Gel parallel zu einem Molekulargewichtsmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nylonmembran mit Anti-FLAG und Anti-RbcL Antikörper analysiert.

In der Membranfraktion von 3xFLAG-Tp konnte trotz mehrerer Waschschriffe RbcL detektiert werden. Jedoch war das Signal erwartungsgemäß deutlich schwächer als im Stroma. 3xFLAG-RpoTp konnte eindeutig im Stroma nachgewiesen werden. Auch in der Membran-Spur war eine leichte Bande zu sehen, die vermutlich vor allem auf die Verunreinigung mit Stromaproteinen zurückzuführen war. Dafür sprach bereits die Detektion von RbcL in den Membranpräparationen, welche möglicherweise auf einige wenige nicht-lysierte Plastiden nach der Lyse zurückzuführen war, die die Membransuspension verunreinigten. 3xFLAG-RpoTp schien also zum größten Teil löslich zu sein. Auch 3xFLAG-RpoTnp konnte eindeutig im Stroma nachgewiesen werden. Es wurden wie schon in Kap. 3.2.3.2 gezeigt zwei Banden detektiert. In der Mitochondrienpräparation konnte ebenfalls 3xFLAG-RpoTnp detektiert werden. Diese Präparation war zwar leicht mit Chloroplasten verunreinigt, wie die

RbcL-Bande bewies, dennoch war trotz schwächerem RbcL-Signal in den Mitochondrien im Vergleich zum Stroma die Polymerase-Bande im Mitochondrienlysate stärker als im Stroma. Die Bande konnte also nicht ausschließlich auf die Plastidenproteinverunreinigung zurückgehen. Somit konnte gezeigt werden, dass in *Arabidopsis* RpoTmp sowohl in Chloroplasten als auch in Mitochondrien lokalisiert ist. Die 3xFLAG-Tmp-Membranfraktion war offensichtlich nicht mit Stromaproteinen verunreinigt. Dennoch wurde hier ein sehr starkes Polymerase-Signal beobachtet. Ein großer Anteil der 3xFLAG-RpoTmp war demnach wie in Azevedo *et al.* (2006) beschrieben membranassoziiert. Es ist aber auch zu berücksichtigen, dass die Membranfraktion zweifach konzentrierter als das Stroma war, somit also keine Rückschlüsse auf das Verhältnis von löslicher zu membrangebundener RpoT innerhalb eines Chloroplasten gezogen werden konnten.

In einer zweiten Lokalisationsstudie sollten noch einmal die Verhältnisse zwischen löslicher und membrangebundener Polymerase beleuchtet werden. Hierfür wurden die von 14 d alten Pflanzen präparierten Chloroplasten lysiert und das Membranpellet nach Waschen im ursprünglichen Lysevolumen resuspendiert und anschließend gleiche Volumina im SDS-Gel aufgetrennt. Abbildung 45B zeigt das Ergebnis des *Western Blots*. Wieder wurden beide Phagentyp-Polymerasen in Stroma und Membranfraktion nachgewiesen, wobei jeweils nur leichte Verunreinigungen mit Stromaproteinen in den Membranfraktionen vorhanden waren. Da sich die Intensitäten der Polymerase-Banden in Stroma und Membran jeweils glichen, war demnach der Anteil löslicher RpoT in 14 d alten Pflanzen wenig größer als der Anteil an membranassoziiierter Polymerase bzw. gleich groß. Natürlich könnte auch das Stroma zu einem geringen Anteil mit Membranproteinen verunreinigt sein. Beim Auftrag gleicher Volumina liegen im Stroma aber weniger Membranproteine als in der Membranfraktion vor, sodass eine RpoT-Bande, die ausschließlich auf eine solche Verunreinigung zurückginge, entsprechend schwächer sein müsste. Da die RpoT-Banden in Stroma und Membran jeweils gleich stark waren, war davon auszugehen, dass tatsächlich lösliche Polymerase vorliegt. Somit konnte die vollständige Membranassoziation, die in Spinat gezeigt wurde, für *Arabidopsis* nicht bestätigt werden.

3.2.3.8 Der Anteil membranassoziiierter NEP nimmt im Lauf der Entwicklung zu

Es wird vermutet, dass die Membranassoziation insbesondere von RpoTmp mit funktionellen Veränderungen der Polymerase im Zuge der Chloroplastendifferenzierung einhergeht (Azevedo *et al.*, 2008). Demnach wird RpoTmp während der lichtinduzierten Reifung der Plastiden an der Thylakoidmembran fixiert und dadurch die Transkriptionsaktivität verringert.

Zwar wurde bereits gezeigt, dass auch im grünen Gewebe lösliche Phagentyp-Polymerase vorliegt, dennoch könnte dieses Modell in Ansätzen zutreffen. In diesem Fall, müsste im Verlauf der Chloroplastendifferenzierung der Anteil membrangebundener gegenüber löslicher Polymerase zunehmen. Durch *Western Blots* sollte diese Annahme für 3xFLAG-RpoTnp und auch 3xFLAG-RpoTp überprüft werden. Dafür wurden wiederum von Pflanzen unterschiedlichen Alters Chloroplasten isoliert, Stroma und Membran präpariert und gleiche Proteinmengen im 7,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt (Abb. 46).

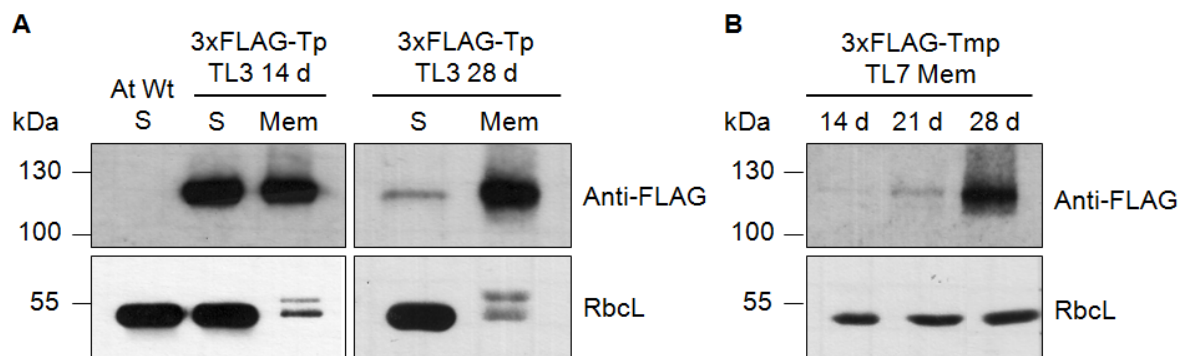


Abb. 46: *Western Blot* zur Analyse der Verhältnisse von löslicher und membranassoziierter Phagentyp-Polymerase zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung in 3xFLAG-Tp TL3 und 3xFLAG-Tmp TL7. Die transgenen Pflanzen und der Wildtyp (At Wt) wurden auf Erde angezogen. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung wurden Chloroplasten isoliert und Stroma (S) und Membranfraktion (Mem) präpariert. 40 µg Protein wurden im 7,5 %igen SDS-Gele parallel zu einem Größenstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) aufgetrennt, auf Nylonmembranen übertragen und mit Anti-FLAG und Anti-RbcL Antikörper analysiert. Die Markerbanden sind in kDa gekennzeichnet. **A** Stroma und Membranfraktion von 14 und 28 d alten 3xFLAG-Tp TL3 sowie Wildtyp-Stroma 14 d alter Pflanzen. **B** Membranfraktionen von 14, 21 und 28 d alten 3xFLAG-Tmp TL7.

Für 3xFLAG-Tp TL3 wurden Stroma und Membranfraktion von 14 und 28 d alten Pflanzen analysiert (s. Abb. 46A). In beiden Membranspuren war nur eine geringe RbcL-Verunreinigung erkennbar. 14 d nach Aussaat waren die Polymerase-Signale in Stroma und Membranfraktion annähernd gleich. Nach 28 d wurde der Großteil der 3xFLAG-RpoTp in der Membranfraktion detektiert. Das Verhältnis verschob sich also im Laufe der Entwicklung in Richtung Membranassoziation. Auch für 3xFLAG-Tmp TL7 (s. Abb. 46B) war zu erkennen, dass trotz gleicher Auftragsmengen und dem Umstand, dass das Expressionslevel während der Chloroplastenentwicklung abnahm (s. 3.2.3.2), die Menge an membrangebundener Polymerase zunahm. Dabei muss angemerkt werden, dass die Detektion von RbcL hier nicht als Membran-Marker diente, sondern als Hinweis auf eine gleichartige Präparation und Befreiung von Stomaproteinen der Membranen. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung der Membranfraktionen wurde ein Anti-Tic40 Antikörper eingesetzt (nicht gezeigt).

Da der Anti-FLAG-Antikörper keine oder nur sehr schwache Kreuzreaktionen mit anderen *Arabidopsis*-Proteinen eingeht, sollten die Ergebnisse der Lokalisation und Membranassoziation auch mittels Immuno-Elektronenmikroskopie bestätigt werden. Allerdings wurde bereits in Vorversuchen mit Fluoreszenzmikroskopie deutlich, dass die Expression der Epitop-markierten Polymerasen auch in 7 d alten Pflanzen viel zu gering für eine Detektion war (Dr. Gerd Hause, Biocenter, Halle/S., pers. Mitteilung).

3.2.3.9 Immunopräzipitation von 3xFLAG-RpoTp und 3xFLAG-RpoTmp

Um potentielle Transkriptionsfaktoren zu identifizieren wurden die transgenen Pflanzen für die Immunopräzipitation eingesetzt. Hierfür wurde Stroma von 21 d alten Wildtyppflanzen, 3xFLAG-Tp TL3 und 3xFLAG-Tmp TL7, sowie Mitochondrienlysat von 3xFLAG-Tp TL7 präpariert. 200 µl dieser Lysate wurden 3 h mit 5 µg Anti-FLAG Antikörper und anschließend üN mit rec-Protein-A-Sepharose™ 4B inkubiert. Die Elution der präzipitierten Proteine erfolgte mit 25 µl 1x Ladepuffer. Das gesamte Eluat sowie Aliquots des eingesetzten Stromas bzw. Mitochondrienlysats und des IP-Überstands wurden im 7,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels *Western Blot* (s. Abb. 47) mit Anti-FLAG analysiert.

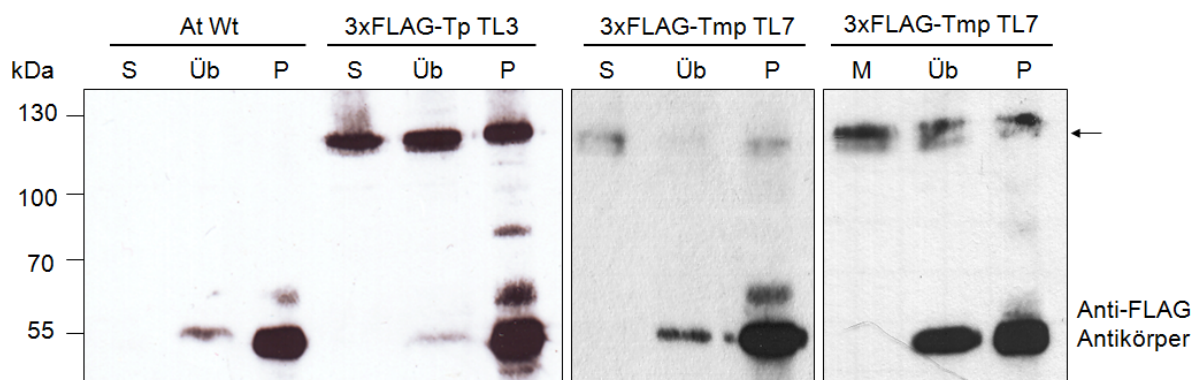


Abb. 47: Immunopräzipitation der Epitop-markierten Phagentyp-Polymerasen aus Stroma und Mitochondrienlysat von 3xFLAG-Tp TL3 und 3xFLAG-Tmp TL7. 200 µl Stroma bzw. Mitochondrienextrakt von Wildtyp (At Wt), 3xFLAG-Tp TL3 und 3xFLAG-Tmp TL7 wurden mit 5 µg Anti-FLAG Antikörper für 3 h und anschließend üN mit 100 µl rec-Protein-A-Sepharose bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 10 Vol. Co-IP-Puffer 1 wurden die präzipitierten Proteine (P) mit 25 µl 1xLadepuffer eluiert und neben Aliquots von Stroma (S) bzw. Mitochondrienlysat (M) und IP-Überstand (Üb) im 7,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Parallel wurde ein Protein-Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) im Gel aufgetrennt. Größen der Markerbanden sind in kDa angegeben. Nach Transfer der Proteine auf Nylonmembranen erfolgte die Immunodetektion mit Anti-FLAG Antikörper. In Überstand und Präzipitat enthaltener Antikörper ist gekennzeichnet. Der schwarze Pfeil deutet auf die jeweilige 3xFLAG-Polymerase.

Im Wildtyp-Experiment wurde der Antikörper effizient präzipitiert. Nur eine geringe Menge verblieb im Stroma und konnte daher im Überstand nach der IP detektiert werden. In der IP mit 3xFLAG-Tp wurde die *getaggte* RpoTp präzipitiert, wobei trotz der effizienten Fällung

des Antikörpers eine signifikante Menge im Überstand verblieb. Ein entsprechendes Ergebnis konnte für die IP mit Stroma und auch mit Mitochondrienlysat von 3xFLAG-Tmp beobachtet werden. Die IP der Epitop-markierten Polymerasen funktionierte also, konnte aber in ihrer Effizienz noch gesteigert werden. Dass Proteine existieren könnten, die mit RpoTp interagieren, wurde durch einen Versuch gezeigt, in dem die im Stroma vorhandene 3xFLAG-RpoTp durch Behandlung mit Formaldehyd (s. 2.2.7) kovalent an ihre potentiellen Interaktionspartner gekoppelt und anschließend im *Western Blot* analysiert wurde. Das Ergebnis dieses *crosslinking* Versuchs ist in Abbildung 48 zu sehen.

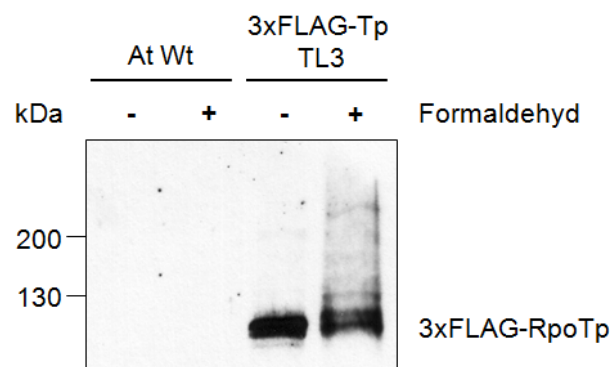


Abb. 48: *Western Blot* Analyse des *crosslinking* von 3xFLAG-RpoTp an potentiell interagierende Proteine. 100 µl Chloroplastensuspension 14 d alter 3xFLAG-Tp TL3-Pflanzen und vom Wildtyp (At Wt) wurden 10 min mit 1 % Formaldehyd inkubiert (s. 2.2.7). Nach Stoppen der Reaktion mit Glycin und Pelletieren der Chloroplasten, wurden diese in Lysepuffer und 1x Ladepuffer aufgenommen und nach Denaturierung bei 65 °C für 15 min im 7,5 %igen SDS-Gel parallel zu einem Molekulargewichtsmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) aufgetrennt. Markerbanden sind in kDa gekennzeichnet. Nach Transfer der Proteine auf eine Nylonmembran erfolgte die Immunodetektion mit Anti-FLAG Antikörper. Parallel zum Formaldehyd-Versuch (+) wurde je ein Ansatz ohne Formaldehydzugabe (-) mitgeführt. Die 3xFLAG-fusionierte Phagenty-Polymerase ist gekennzeichnet.

Im Wildtyp-Kontrollversuch wurde erwartungsgemäß keine 3xFLAG-fusionierte RpoTp detektiert. In 3xFLAG-Tp war die *getaggte* RpoTp deutlich zu erkennen. Im Experiment mit Formaldehyd war das Polymerase-Signal leicht schwächer und oberhalb von RpoTp waren mehrere, zusätzliche, leichte Banden erkennbar, deren Detektierbarkeit mit Anti-FLAG Antikörper auf die Assoziation mit 3xFLAG-RpoTp schließen ließ. Dies zeigte, dass im Stroma bisher unbekannte Proteine mit RpoTp interagieren.

Um diese Proteine nun zu identifizieren, wurden weitere IPs durchgeführt. Um die Effizienz der Präzipitation der jeweiligen RpoT zu maximieren, wurden in den zahlreichen, nachfolgenden IP-Experimenten verschiedene Aspekte des Protokolls variiert. So wurde beispielsweise mehr Stroma eingesetzt, Anti-FLAG® M2 Affinity Gel (Sigma) statt rec-Protein-A-Sepharose plus Antikörper genutzt und IP-Puffer mit geringerer NaCl-Konzentration (Co-IP-Puffer 2; s. 2.2.10.6) verwendet, um ein Abwaschen schwach

interagierender Proteine zu vermeiden. Außerdem wurde Stroma von 7 bis 14 d alten Pflanzen verwendet, da in diesem Alter die Expression von 3xFLAG-RpoTp und -Tmp am stärksten war (s. 3.2.3.2). Die Eluate wurden in SDS-Gelen mit einem Gradienten von 10-15 % aufgetrennt, um in einem Gel sowohl kleine wie auch sehr große Proteine aufzutrennen. Die Gele wurden für eine spätere Identifikation von Proteinbanden mittels MS (*peptide mass fingerprinting*) mit MS-kompatiblen Silber oder kolloidalem Coomassie gefärbt. Abbildung 49 zeigt Beispiele solcher IP-Gele.

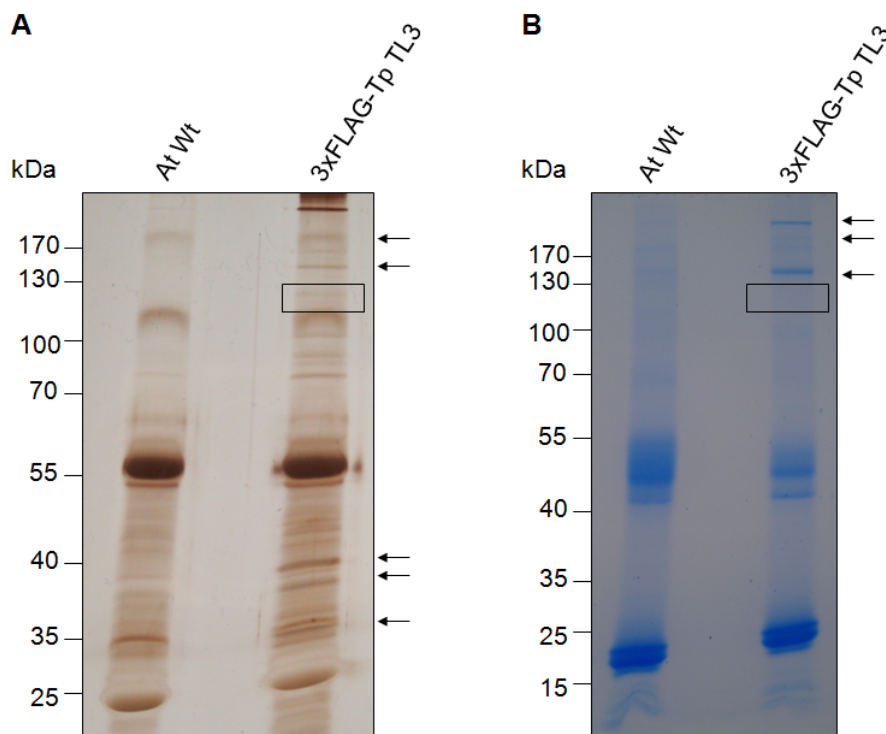


Abb. 49: Gefärbte SDS-Gele verschiedener Co-Immunopräzipitationsversuche mit Stroma der transgenen Linie 3xFLAG-Tp TL3. 200 µl Stroma (ca. 0,5-1,0 mg Protein) der transgenen Linie und des Wildtyps (At Wt) wurden mit 100 µl Anti-FLAG® M2 Affinity Gel üN bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 10 Vol. Co-IP-Puffer 1 wurden die Proteine mit 1x Ladepuffer eluiert. Als Kontrolle zu jeder IP wurde parallel ein Versuch mit Wildtyp-Stroma durchgeführt. Die Eluate der IPs wurden 10-15 % Gradientengelen (s. 2.2.10.6) parallel zu einem Größenstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) aufgetrennt. Markerbandengrößen sind in kDa angegeben. Die Gele wurden mit Silber (A) bzw. kolloidalem Coomassie (B) gefärbt. Schwarze Kästchen zeigen jeweils die präzipitierte 3xFLAG-RpoTp. Schwarze Pfeile kennzeichnen Banden im 3xFLAG-Tp-Eluat, die mittels Massenspektrometrie analysiert wurden.

Die präzipitierte Polymerase (Abb. 49, schwarze Kästchen) war trotz Anreicherung auch im silbergefärbten Gel nur schwer zu erkennen. Die Präzipitation mit Anti-FLAG® M2 Affinity Gel (Abb. 49) war effizienter als mit Protein A-Sepharose (nicht gezeigt). Dennoch war es trotz zahlreicher Modifikationen nicht möglich, mehr Epitop-markierte RpoT zu fällen. Es ist davon auszugehen, dass daraus folgend auch potentiell interagierende Proteine nur in geringen Mengen co-präzipitiert wurden. Trotzdem wurden in einigen IPs zusätzliche Banden

beobachtet (s. Abb. 49, schwarze Pfeile), ausgeschnitten und für die MS-Analyse eingesetzt (s. 2.2.12). Dabei schlugen zwei Analysen fehl, da im einen Fall (Abb. 49A, Silbergel) keine vollständige Entfärbung der silbergefärbten Banden gelang und die restlichen Silber-Ionen offenbar mit der Methode interferierten. Im anderen Fall waren die Banden sehr schwach und die Peptid-Signale bei der MS-Analyse zu schwach und zu wenige, um eine sinnvolle Auswertung zu ermöglichen. In einem weiteren Versuch (Abb. 49B, Coomassie-Gel) gelang es ausreichend Peptide für einen Abgleich mit bekannten Proteinsequenzen mittels MASCOT Peptide Mass Fingerprint (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form_select.html) zu erhalten. Als mögliche Kandidaten wurden dabei die Proteine Ycf1 und Ycf2 (s. 3.2.4) identifiziert. Weitere Proteine, die durch den Abgleich in der SwissProt-Datenbank gefunden wurden, waren beispielsweise die kernkodierte *Phospholipid-transporting ATPase 10*, *Putative calcium-transporting ATPase 13*, *ATPase 2* und *CDC48E*.

Da ein Teil der Phagentyp-Polymerasen membranassoziiert ist und somit auch Membranproteine Interaktionspartner darstellen könnten, wurde auch mit Chloroplasten-Gesamtextrakten, in denen die Membranproteine durch β -DM solubilisiert sind (s. 2.2.7), IPs durchgeführt. Die Präzipitation von 3xFLAG-RpoTp aus diesen Gesamtextrakten funktionierte (nicht gezeigt). Jedoch führte diese Variante nicht zu weiteren, zusätzlichen Proteinbanden im gefärbten SDS-Gel, die analysiert werden konnten.

Weil die Membranassoziation von RpoTnp mit einer Veränderung der Transkriptionsaktivität der Polymerase in Verbindung gebracht wurde (Azevedo *et al.*, 2008), war zudem von Interesse, ob sowohl die löslichen als auch die membranassoziierten, plastidären Phagentyp-Polymerasen transkriptionsaktiv sind. Daher wurde versucht die 3xFLAG-markierten RpoTp und RpoTnp durch eine IP aus Stroma bzw. Membranpräparationen zu präzipitieren, mittels Einsatz von FLAG-Peptiden zu eluieren, und über Zentrifugalkonzentratoren (Microcon® YM-10 Centrifugal Filter Devices; Millipore) einzuengen. Diese Eluate wurden dann in einem spezifischen *in vitro* Transkriptionsassay eingesetzt (s. 2.2.13). Dafür wurde als Matrize der Promotor *Patp8-228/226* verwendet, welcher in vorherigen Transkriptionsassays von *Arabidopsis* RpoTp spezifisch erkannt wurde (Kühn *et al.*, 2007). Leider gelang die Gewinnung von ausreichenden Mengen und ausreichend reiner Polymerase nicht, sodass keine verwertbaren Ergebnisse bei der *in vitro* Transkription erhalten wurden.

3.2.4 Untersuchung der Kandidaten für eine Interaktion: Ycf1 und Ycf2

Da mittels IP mit 3xFLAG-RpoTp als mögliche, interagierende Proteine Ycf1 und Ycf2 gefunden wurden (s. 3.2.3.9), sollten diese Kandidaten nun näher untersucht werden.

Der offene Leserahmen *ycf1* aus *A. thaliana* (GenBank-Zugang: NC_000932) kodiert für ein putatives Membranprotein von 1786 AS Länge, dessen Funktion nicht bekannt ist (UniProtKB/SwissProt-Zugang: P56785). Es besitzt sieben Transmembrandomänen, welche die Chloroplasten-Hüllmembran durchspannen, und eine Lysin-reiche Region im C-terminalen Bereich (s. Abb. 50). Vergleiche von Ycf1 aus *Chlamydomonas* und Angiospermen zeigten konservierte Nukleotidbindestellen auf, so dass Ycf1 eine ATPase-ähnliche Funktion haben könnte (Boudreau *et al.*, 1997).

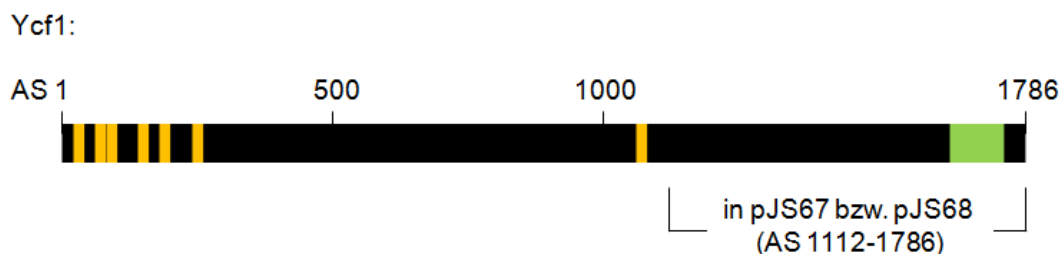


Abb. 50: Schematische Darstellung von Ycf1 mit seinen Proteindomänen. AS = Aminosäure. Der ORF *ycf1* kodiert für ein 1786 AS langes Protein mit 7 Transmembrandomänen (gelb) an den Positionen AS 19-39, AS 68-88, AS 91-111, AS 133-153, AS 176-196, AS 227-247 und AS 1072-1092, sowie einer Lysin-reichen Region (grün) von AS 1638-1737. Der Teil des Proteins, welcher durch die Plasmide pJS67 bzw. pJS68 (s. 2.1.4, Tab. 2) mit einem GST-tag bzw. einem 6xHis-tag exprimiert wird, ist gekennzeichnet.

Der offene Leserahmen *ycf2* aus *Arabidopsis* kodiert für ein 2294 AS langes, Stroma-Protein, welches möglicherweise als ATPase fungiert (UniProtKB/SwissProt-Zugang: P56786). Es besitzt im C-Terminus (AS 1648-1655) eine konservierte Region, welche Ähnlichkeit zum AAA-Motiv (*ATPases associated with different cellular activities*) aufweist (Wolfe, 1994), und daher vermutlich fähig ist, Nukleosidtriphosphate bzw. ATP zu binden und proteolytisch zu spalten. Die in Ycf2 vorhandenen Nukleotidbindestellen sind typisch für die *ftsH*- und *CDC48*-Genfamilien in Grünalgen und Eubakterien, deren Genprodukte an Prozessen wie Zellteilung, Proteolyse und Proteintransport beteiligt sind. Des Weiteren wird beim Durchsuchen der Proteinsequenz nach weiteren Motiven (http://scansite.mit.edu/motifscan_seq.phtml) der Großteil des Proteins (AS 1-1494) als *domain of unknown function* bezeichnet.

Für beide Gene wurde bereits gezeigt, dass ihre Produkte essentiell für das Überleben der Zellen höherer Pflanzen sind (Drescher *et al.*, 2000). Auch das Ycf1-Homolog in *C. reinhardtii* ist essentiell (Boudreau *et al.*, 1997). Zur Überprüfung einer direkten Interaktion

von Ycf1 bzw. Ycf2 mit RpoTp sollten beide Proteine heterolog als His- bzw. GST-Fusionproteine exprimiert, gereinigt und für *pulldown assays* mit GST- bzw. His-RpoTp eingesetzt werden. Dafür wurde für Ycf1 zunächst diejenige Sequenz in pJS-HisEx und pGEX-2TK kloniert, welche für den Bereich des Proteins kodiert, der die Lysin-reiche Region jedoch keine Transmembrandomänen enthält (AS 1112-1786; s. Abb. 46). Die erhaltenen Vektoren pJS67 und pJS68 wurden zur Transformation von *E. coli* BL21-Zellen für die anschließenden Expressionsversuche genutzt. Erste Expressionsversuche von GST-Ycf1 bei unterschiedlichen Temperaturen und in unterschiedlichen Medien resultierten lediglich in Abbauprodukten. Im *Western Blot* konnte nur GST und GST fusioniert mit kürzeren Peptiden detektiert werden (nicht gezeigt). Aus Zeitgründen war es leider nicht mehr möglich, das Fusionsprotein zu exprimieren und zu reinigen. Außerdem wurde versucht die kodierende Sequenz für Ycf2 in pJS-HisEx zu klonieren. Dies und die Klonierung und Expression von verkürzten Varianten gelangen in der verbleibenden Zeit leider nicht.

3.2.5 Co-Präzipitation von NEP-Transkripten mit 3xFLAG-AtRpoTp

Für eine Vielzahl von chloroplastidären Genen sind bereits NEP-Promotoren bekannt und charakterisiert (zusammengefasst in Liere *et al.*, 2011). Dennoch könnte es Gene geben, für die noch nicht bekannt ist, dass ihre Transkription nicht ausschließlich durch PEP sondern auch durch NEP erfolgt. RpoTp müsste mit den entsprechenden RNAs assoziiert sein. Des Weiteren wird noch immer die entwicklungsabhängige Rolle von NEP bei der Arbeitsteilung mit PEP diskutiert, weshalb es von Interesse ist, welche Transkripte zu einem bestimmten Zeitpunkt der Chloroplastenentwicklung an RpoTp gebunden sind. Daher wurden die transgenen Linien 3xFLAG-Tp TL3 und 3xFLAG-Tp TL6 für RIP-Chips (s. 2.2.11) verwendet, um assoziierte RNAs zu identifizieren. Dafür wurde Stroma von 14 d alten Pflanzen präpariert und wie in 2.2.10.5 beschrieben für IPs verwendet. Zur Überprüfung der erfolgreichen Präzipitation der 3xFLAG-RpoTp wurden Aliquots verschiedener Schritte der IP mittels *Western Blot* analysiert. Als Vorversuch wurden die erhaltenen Präzipitate für den *Dot Blot* eingesetzt, um Hinweise darauf zu erhalten, ob überhaupt RNAs co-präzipitiert werden. Abbildung 51 zeigt einen entsprechenden Versuch, für den in der IP Stroma von 3xFLAG-Tp TL6 und dem Wildtyp als Kontrolle verwendet wurde.

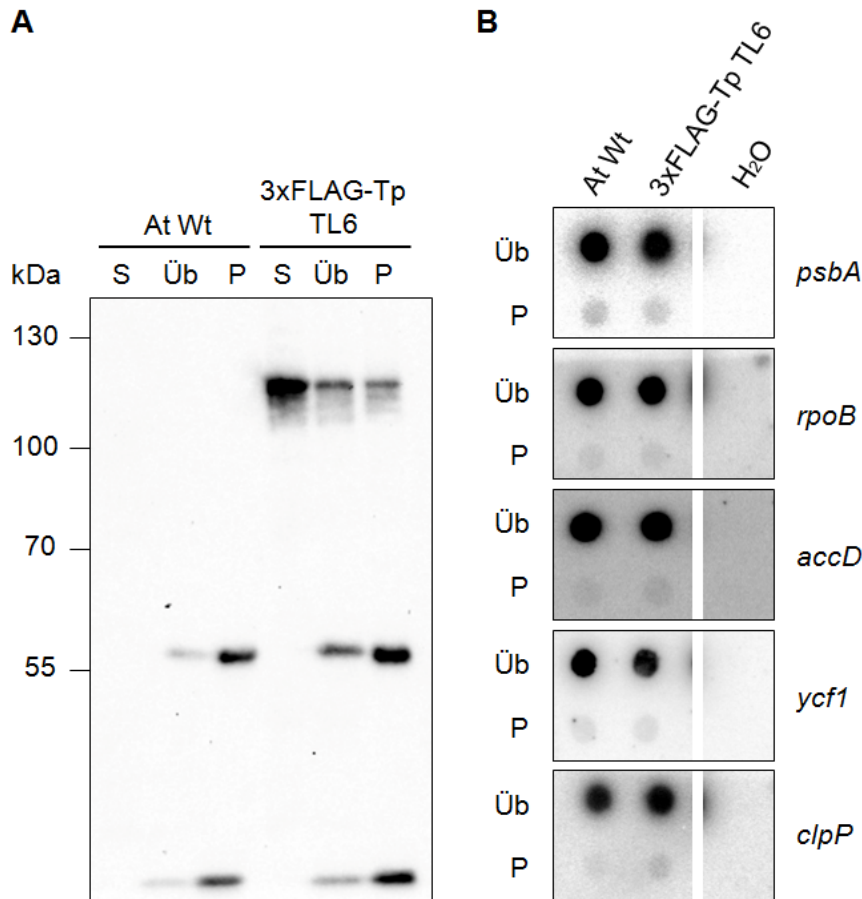


Abb. 51: Dot Blot Analyse der IP mit 3xFLAG-Tp TL6 und korrespondierender Western Blot. 200 µl Stroma von Wildtyp (At Wt) bzw. 3xFLAG-Tp TL6 wurden mit 5 µg Anti-FLAG Antikörper für 1 h und anschließend mit 75 µl Dynabeads® Protein G 1 h bei 4 °C inkubiert (s. 2.2.10.5). **A** Aliquots von eingesetztem Stroma (S), IP-Überstand (Üb) und IP-Pellet (P) wurden im 7,5 %igen SDS-Gel parallel zu einem Größenstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Markerbanden sind in kDa gekennzeichnet. Die Immunodetektion erfolgte mit Anti-FLAG Antikörper. **B** Die aus Überstand und Pellet extrahierten RNAs wurden in Aliquots wie in 2.2.9.14 beschrieben auf eine Nylonmembran transferiert. Als Kontrolle wurde außerdem Wasser (H₂O) geblottet. Die Membranabschnitte wurden mit spezifischen DNA-Sonden für *psbA*-, *rpoB*-, *accD*-, *ycf1*- und *clpP*-Transkripte hybridisiert. Üb = Überstands-RNA, P = Pellet-RNA.

Der Western Blot (s. Abb. 51A) zeigte, dass die 3xFLAG-fusionierte RpoTp in der Mutante präzipitiert wurde. Im Wildtyp-Eluat waren lediglich die Antikörper-Banden erkennbar. Für den Dot Blot wurde die aus IP-Überstand und IP-Pellet extrahierte RNA auf eine Nylonmembran übertragen (s. 2.2.9.14) und mit spezifischen DNA-Sonden für PEP- und NEP-Transkripte hybridisiert (s. Abb. 51B). Im Überstand waren erwartungsgemäß jeweils kräftige Signale für alle Transkripte erkennbar. Im Falle einer Co-Präzipitation von RNA mit 3xFLAG-RpoTp müsste das Pellet-Signal von 3xFLAG-Tp TL6 gegenüber dem Wildtyp-Signal aufgrund der Anreicherung stärker sein. Ein entsprechender Effekt konnte für die NEP-Transkripte *rpoB* und *accD*, sowie das durch NEP und PEP transkribierte Gen *ycf1* nicht beobachtet werden. Lediglich für *clpP* konnte eine leichte Anreicherung gezeigt werden. Die

bereits bekannten NEP-Transkripte wurden also nicht effizient co-präzipitiert. Dennoch wurde versucht eine Co-Präzipitation im RIP-Chip zu zeigen, da die Methode wesentlich sensitiver ist als der *Dot Blot*. Im Experiment wurde die IP mit 3xFLAG-Tp TL6-Stroma und Wildtyp-Stroma genauso durchgeführt wie für den *Dot Blot* und die erfolgreiche Präzipitation der Polymerase mittels *Western Blot* überprüft (nicht gezeigt). Die jeweils aus Überstand und Pellet extrahierten RNAs wurden mit einem das *Arabidopsis*-Plastom überspannenden *microarray* hybridisiert und die mit 3xFLAG-RpoTp präzipitierten RNAs durch Fluoreszenzanalyse identifiziert (s. 2.2.11). Zur Darstellung des Resultats (Abb. 52) wurden die Fluoreszenzintensitätsverhältnisse aus Pellet- zu Überstands-Signalen für die IP und die Kontroll-IP berechnet und anschließend das Verhältnis aus IP zu Kontroll-IP gebildet. Diese Werte wurden als differentielle Anreicherung gegen die Position der Sonden des *arrays* auf dem Plastom aufgetragen. Da insgesamt ein starker Hintergrund festgestellt wurde, wurden nur Werte ab 2,5 als signifikante Anreicherung festgelegt (Abb. 52, rote Linie). Die am stärksten angereicherten RNAs wurden gekennzeichnet. Die mit 3xFLAG-RpoTp co-präzipitierte RNA hybridisierte mit zwei der auf dem *array* gedruckten *ycf2*-Abschnitte, mit *rbcL*, mit Exon 1 und 2 von *ndhB*, mit der *trnG* plus *trnR* repräsentierenden *array* Sonde, und mit der Sonde für den Bereich *psbE-petL*. Somit wurden bekannte (*ycf2*; Hajdukiewicz *et al.*, 1997) bzw. potentielle NEP-Transkripte (*ndhB*) in Assoziation mit RpoTp gefunden. Allerdings könnte es sich bei der Co-Präzipitation von *ndhB* auch um ein Artefakt aufgrund seiner Position im plastidären Genom handeln (s. Diskussion Kap. 4.2.5). Bei dem *rbcL*-Abschnitt handelt es sich nicht um den Überlappungsbereich von *atpB* und *rbcL*, sondern um den kodierenden Bereich. Die Anreicherung der PEP-Transkripte *rbcL* und *psbE* sowie der tRNAs wird in Kap. 4.2.5 diskutiert. Insgesamt wurden nur wenige RNAs angereichert, insbesondere wenige der bekannten NEP-Transkripte, was teilweise auf die geringe Menge an präzipitierter Polymerase zurückgeführt werden konnte. Es müssten demnach größere Mengen Stroma eingesetzt werden und Wiederholungen durchgeführt werden, um eine statistische Auswertung zu ermöglichen. Dies sowie die Verwendung jüngerer Materials waren in der verbleibenden Zeit nicht mehr möglich.

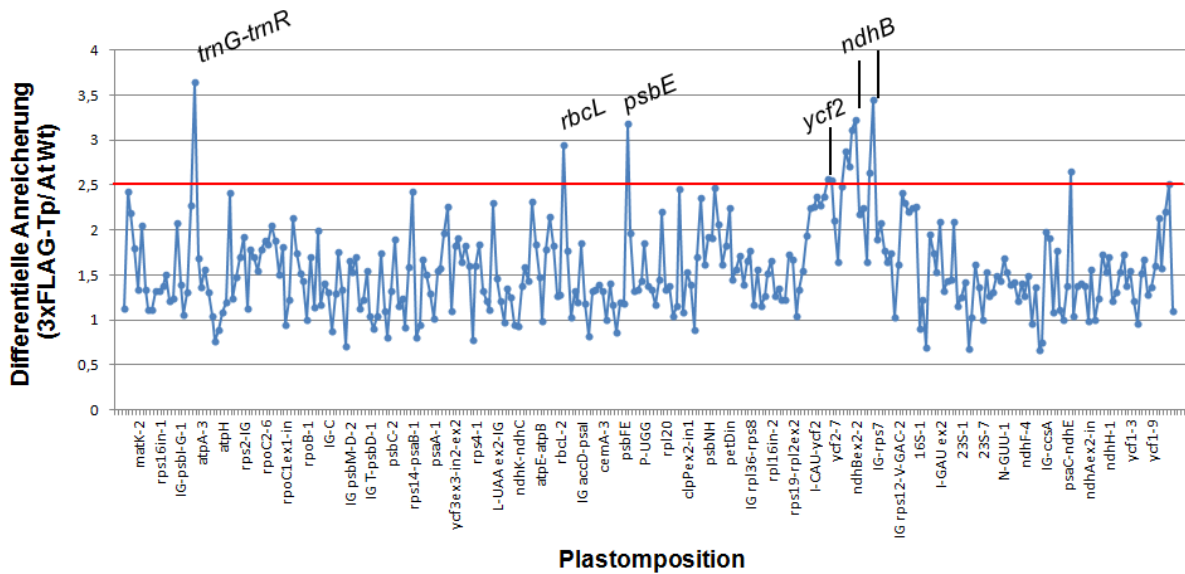


Abb. 52: Identifikation von mit 3xFLAG-RpoTp-assoziierten RNAs mittels RIP-Chip. In der IP mit 3xFLAG-Tp-Stroma co-präzipitierte RNAs und Überstand-RNAs wurden fluoreszenzmarkiert und mit einem das Plastom überspannenden *microarray* hybridisiert. Die Fluoreszenzintensitätsdaten wurden wie in 2.2.11 beschrieben ausgewertet und die differentielle Anreicherung co-präzipitierter RNAs gegen die Plastomposition aufgetragen. Signale signifikant angereicherter RNAs befinden sich oberhalb der roten Linie. Angereicherte RNAs sind mit ihren Namen beschriftet.

Ein RIP-Chip-Versuch mit 3xFLAG-Tmp wurde durchgeführt. Jedoch zeigte bereits die *Western Blot* Analyse, dass die Polymerase nicht bzw. nur in sehr geringen Mengen präzipitiert wurde. Daher wurde auf die Hybridisierung mit dem *array* verzichtet. Für weitere Versuche genügte die verbleibende Zeit nicht.

Sowohl der *Dot Blot* als auch der RIP-Chip zeigten, dass RpoTp mit RNAs assoziiert war, wodurch eine direkte Beteiligung an der Transkription gezeigt wurde. Andere Methoden wiesen die Transkriptionsaktivität bisher nur indirekt anhand von Transkriptmengen bzw. in *in vitro* Assays nach. Außerdem zeigten die Ergebnisse, auch wenn nur wenige RNAs präzipitiert wurden, dass die Methode und die in dieser Arbeit erzeugten, transgenen Pflanzen grundsätzlich geeignet waren, um assoziierte RNAs zu identifizieren. Dies ermöglicht in der Zukunft die Identifikation der zu einem bestimmten Zeitpunkt der Chloroplastenreifung durch RpoTp und auch RpoTmp transkribierten Gene. Insofern ist auch die Präzipitation unerwarteter RNAs wie der PEP-Transkripte *rbcL* und *psbE* interessant, da NEP durchaus auch an der Transkription solcher Gene beteiligt sein könnte (Zhelyazkova *et al.*, 2012b), und mittels RIP-Chip bisher unbekannte NEP-Transkripte gefunden werden könnten.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der entwicklungsspezifischen Rolle von NEP in Tabak durch Promotoraustausche in transplastomischem Tabak

Da die meisten plastidären Haushaltsgene NEP- und PEP-Promotoren besitzen (Vera und Sugiura, 1995; Allison *et al.*, 1996), stellt sich die Frage, wie sich die beiden RNA-Polymerase-Aktivitäten im Zuge der Chloroplastendifferenzierung die Arbeit bei der Transkription teilen. Zahlreiche Studien beschäftigten sich bereits mit der Abundanz und Aktivität der Enzyme, der Nutzung verschiedener Promotoren und der Abundanz von NEP- und PEP-Transkripten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der pflanzlichen Entwicklung (Baumgartner *et al.*, 1993; Tiller und Link, 1993; Hajdukiewicz *et al.*, 1997; Isono *et al.*, 1997a; Kapoor *et al.*, 1997; Baginsky *et al.*, 2004; Cahoon *et al.*, 2004; Emanuel *et al.*, 2004; Demarsy *et al.*, 2006 und 2012; Wurbs *et al.*, 2007; Barsan *et al.*, 2010; Zhelyazkova *et al.*, 2012b). Das Modell einer ausschließlich sequentiellen Arbeitsteilung, in welchem NEP vor allem in jungem, nicht-grünem Gewebe aktiv ist und PEP in reifen, photosynthetisch aktiven Chloroplasten, musste erweitert werden, da beispielsweise gezeigt wurde, dass sich in Mais die Akkumulation von NEP-abhängigen Transkripten im Laufe der Entwicklung wenig änderte (Cahoon *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit wurde die entwicklungsspezifische Rolle von NEP gegenüber PEP durch die Herstellung transplastomischer Tabakpflanzen mit veränderten bzw. gegen PEP-Promotoren ausgetauschten NEP-Promotoren der Gene *accD*, *rpoB* und *rrn16* näher beleuchtet.

4.1.1 Erzeugung der transplastomischen Pflanzen

Zur Erzeugung transplastomischer Tabakpflanzen wurden *N. tabacum* Wildtyppflanzen mittels „biolistischer“ Transformation stabil mit verschiedenen Vektoren transformiert (Svab *et al.*, 1990a; Svab und Maliga, 1993). Als Resistenzmarker wurde ein chimäres *aadA*-Gen verwendet, dessen Expression vom *psbA*-Promotor aus erfolgt und Resistenz gegen Spectinomycin und Streptomycin vermittelt (Shaw *et al.*, 1993; Svab *et al.*, 1990b). Die entsprechende *aadA*-Kassette wurde aus dem Vektor pPRV111A amplifiziert (Zoubenko *et al.*, 1994) und für die Klonierung der Transformationsplasmide eingesetzt. Es wurden Vektoren hergestellt, die den Austausch des Typ-I NEP-Promotors *PaccD*-129 bzw. *PrpoB*-345 durch den PEP-Promotor *PatpB*-255, das Ausschalten von *PaccD*-129 durch Veränderung des Promotormotivs von TATA nach GCGC, sowie den *knock out* des Typ-I NEP-Promotors *Prrn16*-64 durch Änderung des Promotormotivs CTTG zu GCGC

ermöglichten. Die Transformation der korrespondierenden Plasmide (s. 3.3.1, Abb. 5, 6, und 7) verlief erfolgreich. Demgegenüber gelang es nicht, entsprechende Kontrollvektoren, welche lediglich die homologe Rekombination der *aadA*-Kassette vermitteln sollten, in die Pflanzen einzubringen. Durch die erfolgreiche Transformation der Vektoren mit den Promotorveränderungen wurde bereits gezeigt, dass die Integration der Kassette an den erforderlichen Orten des Plastoms die Physiologie der Pflanzen nicht störte. Da die Kontrollvektoren dieselben Tabak-Sequenzbereiche enthielten wie die übrigen Plasmide, sind möglicherweise zu lange Rekombinationsbereiche ursächlich für das mehrfache Fehlschlagen der Transformation. Die zur Rekombination benötigten Homologiebereiche umfassten in den Plasmiden jeweils ca. 600-1000 bp. Es wurde beobachtet, dass im Zuge des Rekombinationsprozesses mehrere, einzelne Rekombinationsereignisse zwischen der Tabak-Zielsequenz und der Donor-DNA stattfinden können (Kavanagh *et al.*, 1999). Dabei kann es zum Ausschluss einzelner Bereiche der Donorsequenz bei der Integration kommen. Im Hinblick darauf sollen insbesondere zu lange Homologiebereiche problematisch sein (Dr. Karsten Liere und Dr. Reimo Zoschke, pers. Mitteilung). Daher könnte die Integration der *aadA*-Kassette fehlgeschlagen sein. Wahrscheinlich wäre die Transformation von Kontrollvektoren mit kürzeren, homologen Sequenzen erfolgreich. Allerdings wurden im Zuge dieser Arbeit keine neuen Plasmide hierfür kloniert, da der gesamte Transformations- und Selektionsprozess zeitaufwendig ist, und wegen der wenigen, verbleibenden Zeit mit der Analyse der vorhandenen transplastomischen Pflanzen begonnen werden musste.

Stattdessen wurde als Ersatz-Kontrolle bei allen Versuchen der Tabak-Wildtyp zum Vergleich herangezogen. Die Verwendung des Wildtyps als Kontrolle ist dann vertretbar, wenn ausgeschlossen werden kann, dass die Insertion der *aadA*-Kassette am jeweiligen Integrationsort einen Effekt auf flankierende Gene hat. In dieser Arbeit wurde der Resistenzmarker in die intergenischen Regionen zwischen *rbcL* und *accD* (PEP/*accD* und Δ NEP/*accD*), *trnV* und *rrn16* (Δ NEP/*rrn16*) sowie *trnC* und *rpoB* (PEP/*rpoB*) integriert. Für die intergenischen Bereiche *trnV/rrn16* und *rbcL/accD* wurde bereits gezeigt, dass die Insertion eines Markergens nicht mit der Expression flankierender Gene interferierte (Staub und Maliga, 1992 und 1993; Svab und Maliga, 1993). Daher wurde der Wildtyp für Versuche mit PEP/*accD*, Δ NEP/*accD* und Δ NEP/*rrn16* als adäquate Kontrolle gewertet. Auch für mehrere, andere intergenische Sequenzen wurde kein Effekt durch Insertion eines Markergens beobachtet (Übersicht in Maliga, 2004; Ahlert *et al.*, 2009; Maliga und Bock, 2011). Resultierend aus zahlreichen Versuchen mit transplastomischen Pflanzen wurde geschlossen, dass es keine Positioneffekte auf dem Plastidengenom bei der Insertion der *aadA*-Kassette

geben sollte und somit der Wildtyp auch für die *rpoB*-Mutante PEP/*rpoB* eine sinnvolle Kontrolle darstellen sollte. Im späteren Verlauf der Versuche wurde durch die dRNA-Seq Daten allerdings deutlich, dass möglicherweise wenige Transkripte in der Kasette initiiert werden (s. 4.1.2, 4.1.4 und 4.1.5).

Auch die Transformation mit Vektoren, die Austausch der Promotoren *PclpP1*-53 und *PtrnE*-UUC vermitteln sollten, war trotz viermaliger Wiederholung nicht möglich. Der *clpP1*-Promotor sollte einerseits durch eine Veränderung des *non-consensus*-Motivs geschwächt bzw. ausgeschaltet werden. Shikanai *et al.* (2001) zeigten in Studien mit *aadA*-Insertionen in *clpP1* bereits, dass es nicht möglich war, homoplastomische Pflanzen zu erhalten. Durch Kuroda und Maliga (2003) wurde bestätigt, dass *clpP1* essentiell für die Pflanzenentwicklung ist. Möglicherweise führte die in dieser Arbeit erzeugte Veränderung des Promotormotivs zu einem vollständigen *knock out* des Promotors, was die Etablierung transplastomischer Sprösslinge verhinderte. Allerdings besitzt *clpP1* weitere Promotoren, von denen der PEP-Promotor *PclpP1*-95 und der NEP-Promotor *PclpP1*-173 im Vektor stromabwärts der *aadA*-Kassette lagen, und somit nach Integration des Konstrukts ins Plastom intakt sein sollten. Die Insertion der *aadA*-Kassette im intergenischen Bereich zwischen *rps12* und *clpP1* sollte keinen negativen Effekt haben (Shikanai *et al.*, 2001; Kuroda und Maliga, 2003). Doch auch der Ersatz des *clpP1*-Promotors durch *PpsbA*-85 funktionierte nicht, ebenso wie der Ersatz von *PtrnE*-UUC durch *PrpoB*-345 bzw. das Ausschalten des *trnE*-Promotors. Daher kommen möglicherweise andere Gründe für die erfolglose Transformation in Frage. Beispielsweise könnten Probleme im technischen Ablauf aufgetreten sein. Dies ist jedoch insofern unwahrscheinlich, als jedes Konstrukt viermal zur Transformation eingesetzt wurde und die Transformation anderer Konstrukte bereits gelungen war. Da die durch die Vektoren vermittelten Veränderungen für die Physiologie der Pflanzen problematisch sein könnten, wurde auch versucht, transplastomische Sprösslinge zu erhalten, indem der Selektionsdruck nach der „biolistischen“ Transformation durch geringere Spectinomycin-Konzentration verringert wurde. Dabei entwickelten sich erwartungsgemäß zahlreiche Sprösslinge, jedoch keine positiven Transformanten. Somit wurde die Untersuchung der Promotorveränderungen auf die Gene *accD*, *rpoB* und *rrn16* beschränkt.

Für die erzeugten transplastomischen Pflanzen wurde zuerst die korrekte Integration der erwünschten Sequenzen durch PCR und anschließende Sequenzierung überprüft. Daraus resultierend wurden die transplastomischen Linien PEP/*accD* TL2, Δ NEP/*accD* TL2 und TL21, PEP/*rpoB* TL1 und TL2, sowie Δ NEP/*rrn16* für die weiteren Versuche ausgewählt. Für diese Linien (Parentalgeneration) wurde anschließend der Segregationsstatus überprüft.

Hierfür wurden zunächst *Southern Blot* Analysen durchgeführt (s. Kap. 3.1.2; Abbildungen 9, 10, 11 und 12), welche für alle *accD*- und *rpoB*-Mutanten in der P- und F1-Generation auf Heteroplastomie hindeuteten. Für Δ NEP/*rrn16* hingegen wurde kein wildtypisches Signal detektiert, was auf Homoplastomie dieser Linie hinwies. Die Anzucht der F1-Samen auf Spectinomycin-haltigem Medium brachte für PEP/*accD* TL2 ausschließlich grüne Keimlinge hervor, wohingegen die Nachkommen der übrigen transplastomischen Linien in grüne und gebleichte Keimlinge spalteten. Es ist bekannt, dass der Gentransfer von Plastiden zum Nukleus ein fortschreitender Prozess ist (Timmis *et al.*, 2004; Leister, 2005), sodass plastidäre Tabak-Sequenzen im Kern detektiert werden können (Ayliffe und Timmis, 1992), die wiederum zu einem schwachen, persistierenden Wildtyp-Signal führen können. Darum wurde mit Restriktionsenzymen, die außerhalb der Rekombinationsgrenzen des Transformationsvektors schnitten, im *Southern Blot* überprüft, ob die wildtypischen Signale in den Mutanten-Proben auf Kopien der Gene *accD* bzw. *rpoB* im Nukleus zurückzuführen waren. Für PEP/*rpoB* konnte danach sowohl in der F1- als auch der F2-Generation keine Wildtyp-Bande mehr beobachtet werden. Für PEP/*accD* und Δ NEP/*accD* dagegen wurde auch nach zusätzlichen Regenerationsrunden weiterhin ein zweites Signal detektiert, welches allerdings in der F2-Generation oberhalb der Wildtyp-Bande migrierte (s. Kap. 3.1.2, Abb. 10). Gemeinsam mit den Analysen chloroplastidärer DNA deuteten diese *Southern Blot* Analysen auf mögliche Genfragmente im Kern hin und somit auch auf Homoplastomie der verschiedenen, transplastomischen Linien. Dennoch zeigte die Aussaat der F2-Samen auf MS_{Spec} eine deutliche Aufspaltung in grüne, weiße und grün-weiß-gescheckte Keimlinge für alle Linien außer PEP/*accD*. Reziproke Kreuzungen der Mutanten mit dem Tabak-Wildtyp zeigten schließlich eindeutig, dass es lediglich für die transplastomische Linie PEP/*accD* TL2 gelungen war, homoplastomische Pflanzen zu erzeugen. Eine strikte, maternale Vererbung von Plastiden ist für viele Pflanzenspezies bekannt (Hagemann, 1992; Reboud und Zeyl, 1994; Mogensen, 1996). Allerdings konnte in Tabak in verschiedenen Studien auch schon eine paternale Weitergabe von Plastidengenen gezeigt werden (Avni und Edelman, 1991; Ruf *et al.*, 2007; Svab und Maliga, 2007; Thyssen *et al.*, 2012). Dieser Prozess kommt jedoch selten vor. In der Nachkommenschaft der Kreuzungen aus der Mutante als mütterlichen Elter und dem Wildtyp als väterlichen Elter wurden zahlreiche weiße Keimlinge auf Spectinomycin-haltigem Medium gefunden. Daher wurde ausgeschlossen, dass diese aus einer zufälligen, paternalen Vererbung resultierten. Somit konnte aus den Kreuzungen eindeutig auf Heteroplastomie geschlossen werden. Dennoch wurden die transplastomischen Pflanzen für Versuche verwendet, da aufgrund der schwachen bzw. nicht vorhandenen Wildtyp-Signale in

den *Southern Blot* Analysen und des überwiegenden Anteils grüner Keimlinge in den Keimungstests davon ausgegangen werden konnte, dass der Großteil der plastidären DNA von den jeweiligen Transplastomen repräsentiert wurde.

Wie ist es zu erklären, dass die transplastomischen Pflanzen trotz zahlreicher Regenerationsrunden nicht homoplastomisch wurden? Dass das grundsätzliche Prozedere, sowie Medien und Lösungen korrekt waren, wurde dadurch deutlich, dass für PEP/*accD* eine homoplastomische Linie erhalten wurde. Im Zuge der Segregation werden Chloroplasten mit Wt-Plastomen weniger effizient vermehrt als Plastiden mit Transplastomen, weshalb eine interplastidäre Homoplasmie relativ schnell erreicht wird (Maliga, 2004). Der Ausschluss von Wildtyp-Plastomen gegenüber Transplastomen aus demselben Chloroplast hingegen ist schwieriger, da grundsätzlich bereits eine oder wenige Kopien des Resistenzmarkers ausreichen, um eine Resistenz zu erzeugen (Maliga, 2004). Dennoch erfolgt dieser Prozess im Zuge von Plastiden- und Zellteilungen für gewöhnlich. Daher sind möglicherweise Gründe für die Heteroplastomie verantwortlich, die mit der Funktion der jeweiligen Gene verknüpft sind:

Im Fall von *rrn16* muss erwähnt werden, dass die Pflanzen vier Regenerationsrunden unterzogen wurden. Die *Southern Blot* Analysen und die ersten Anzuchten auf Spectinomycin-haltigem Medium ließen stets auf homoplastomische Pflanzen schließen. Erst im späteren Verlauf der Arbeit spalteten die Keimlinge bei Aussaat in grüne und gebleichte und wurden die erwähnten Kreuzungsergebnisse erhalten. Zu diesem Zeitpunkt genügte die verbleibende Zeit nicht, um die Pflanzen erneut steril anzuziehen, mehrfach zu regenerieren und Samen zu gewinnen. Möglicherweise würden weitere Regenerationsrunden homoplastomische Pflanzen hervorbringen. Da in Tabak das *rrn*-Operon vorrangig von PEP transkribiert wird, sollte das vollständige Ausschalten des NEP-Promotors möglich sein. Für *accD* wurde bereits gezeigt, dass ein *knock out* des Gens letal ist (Kode *et al.*, 2005). Dass *accD* essentiell für die Blattentwicklung ist, könnte erklären, warum trotz erneuter Regeneration der F1-Generation von Δ NEP/*accD* TL2 und TL21 weiterhin Wildtyp-Plastome erhalten wurden. Für *rpoB* wurde der NEP-Promotor durch einen PEP-Promotor ausgetauscht. Möglicherweise konnte PEP in diesem Fall die Transkription durch NEP nicht vollständig ersetzen, sodass die Entwicklungsdefizite zu Beginn der Chloroplastenreifung zu groß für eine Etablierung homoplastomischer Pflanzen waren und ein 100 %iger Austausch nicht funktionierte. Diese funktionellen Zusammenhänge werden in den Kapiteln 4.1.2, 4.1.4 und 4.1.5 unter Berücksichtigung des Phänotyps der transplastomischen Linien, sowie der Effekte auf RNA- und Proteinebene näher beleuchtet.

4.1.2 Das Ausschalten des *rrn16*-NEP-Promotors hat kaum Effekte auf die Transkription des *rrn*-Operons

Das *rrn*-Operon wird in Tabak durch PEP und NEP transkribiert. Die ursprüngliche Kartierung und Charakterisierung der *rrn*-Promotoren in Tabak erfolgte in BY2-Zellkulturen (Vera und Sugiura, 1995) und *rpoB*-Deletionsmutanten (Allison *et al.*, 1996). Dabei wurde die PEP-Initiationsstelle an Position -113/114 stromaufwärts des 5'-Terminus der reifen 16S rRNA kartiert (Allison *et al.*, 1996) und die Initiationsstelle für NEP an Position -64 (Vera und Sugiura, 1995). Zwar zeigten *primer extension* Analysen in Tabak und anderen dikotylen Spezies, dass PEP eine übergeordnete Rolle bei der Transkription des *rrn*-Operons innehat (Vera und Sugiura, 1995; Sriraman *et al.*, 1998b; Courtois *et al.*, 2007). Da aber der NEP-Promotor trotzdem genutzt wird, wurde seine entwicklungsabhängige Rolle in einem transplastomischen Ansatz untersucht. *Prrn16-64* wurde durch Mutagenese des Motivs von CTTG zu GCGC, welches deutlich vom bisher bekannten NEP-Konsensus YRTa abweicht, ausgeschaltet und die transplastomische Linie Δ NEP/*rrn16* erzeugt.

Für die transplastomische Linie Δ NEP/*rrn16* war sowohl bei Anzucht auf Erde als auch auf MS-Medium und unter Salz- und Trockenstress nur in den ersten 2-3 Tagen eine leichte Wachstumsverzögerung gegenüber dem Wildtyp zu beobachten (s. Kap. 3.1.3). Im restlichen Verlauf der Entwicklung unterschied sich der Phänotyp der Mutante nicht vom Tabak-Wildtyp. Auch die Transkriptmengen von *rrn16* zeigten 7, 10 und 14 d nach Aussaat keine Unterschiede zwischen transplastomischer Pflanze und Wildtyp (s. Kap. 3.1.6.1). Des Weiteren wurde durch *primer extension* Analysen deutlich, dass der *rrn16*-PEP-Promotor 3, 7, 10 und 14 d nach Aussaat in Mutante und Wildtyp jeweils gleich stark genutzt wurde (s. Kap. 3.1.4), während der NEP-Promotor tatsächlich ausgeschaltet war. Teilweise wurden in der Mutante sehr schwache Signale für den NEP-Promotor beobachtet, die jedoch in der heteroplastomischen Pflanze höchstwahrscheinlich auf restliche Wildtyp-Plastome zurückgingen. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass *primer extension* Analysen nur bedingt quantitative Aussagen zulassen, deuteten diese Analysen darauf hin, dass zu allen untersuchten Zeitpunkten die Transkription des *rrn*-Operons hauptsächlich durch PEP erfolgt und das Fehlen des intakten NEP-Promotors auch zu frühen Zeitpunkten der Chloroplastenreifung scheinbar nicht durch eine verstärkte PEP-abhängige Transkription ausgeglichen wird. Dies wurde durch die Analyse des primären Transkriptoms mittels *deep sequencing* bestätigt (s. Kap. 3.1.5.3). Während die dem NEP-Promotor entsprechende TSS vermutlich aufgrund ihrer geringfügigen Nutzung weder in Wildtyp noch Mutante detektiert werden konnte, waren die dem PEP-Promotor entsprechende TSS sowie die bekannten Prozessierungsstellen deutlich zu erkennen, und in der Mutante nicht mehr *reads* an diesen

Stellen kartiert als im Wildtyp. Allerdings war in den *primer extension* Analysen in $\Delta\text{NEP}/rrn16$ stets auch eine unerwartete, zusätzliche Bande stromaufwärts des ausgeschalteten NEP-Promotors zu beobachten, die interessanterweise auch in den $\Delta rpoA$ -Pflanzen detektiert wurde. In $\Delta rpoA$ (Serino und Maliga, 1998) wird der PEP-Promotor nicht genutzt, da durch Deletion des Gens *rpoA* keine funktionelle PEP assemblieren kann. Daher erfolgt auch eine verstärkte Transkription am NEP-Promotor (s. Kap. 3.1.4, Abb. 18). Ein zusätzliches Signal wurde aber bislang nicht beobachtet (Dr. Karsten Liere, pers. Mitteilung), sondern erst in dieser Arbeit detektiert. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass es sich dabei z.B. um eine Verunreinigung oder unspezifische Bande handelte. Allerdings konnte das Signal in $\Delta\text{NEP}/rrn16$ stets reproduziert werden. Es wurde beobachtet, dass diese Bande bereits in 3 d alten Keimlingen detektierbar war, etwa 7 d nach Aussaat seine maximale Intensität erreichte und danach abnahm, während die Signale des PEP-Promotors von 7-14 d annähernd gleich stark blieben. Zahlreiche *primer extension* Analysen deuteten nicht darauf hin, dass diese Bande als Abbau- oder Prozessierungsprodukt aus Transkripten hervorging, die in der *aadA*-Kassette initiiert wurden. Als Ursprung des unbekannten Signals wurde daher zunächst entweder ein alternativer Promotor vermutet bzw. eine bisher unbekannte Prozessierungsstelle für PEP-abhängige Transkripte. Letzteres würde natürlich mit dem Erscheinen der Bande in $\Delta rpoA$ -Pflanzen interferieren und untermauern, dass das Signal in dieser Mutante ein Artefakt darstellte. Also wurde RNA der Mutante und des Wildtyps vor einer anschließenden *primer extension* Analyse mit Terminator™ 5'-Phosphate-Dependent Exonuclease (TEX) verdaut, um prozessierte RNA zu entfernen und primäre Transkripte anzureichern. Allerdings veränderte sich das Muster der Signale nicht. Die charakteristische Prozessierungsbande an Position -30 (Vera *et al.*, 1993; Vera und Sugiura, 1995) konnte weiterhin detektiert werden. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Signale dieser prozessierten RNA stets so kräftig waren, dass die Menge an eingesetzter TEX möglicherweise nicht ausreichte um die RNA zu verdauen, und daher kein Effekt auf das Bandenmuster beobachtet werden konnte. Somit konnte weder ausgeschlossen werden, dass die zusätzliche Bande ein Prozessierungsprodukt darstellte, noch, dass sie einen Promotor repräsentierte. Zur Klärung müsste der Versuch mit größeren Mengen TEX wiederholt werden. Gegen einen alternativen Promotor als Ursprung dieser Bande spricht der Umstand, dass in $\Delta\text{NEP}/rrn16$ die Transkriptionsinitiation in diesem Fall in der GC-reichen Region des durch Mutagenese veränderten NEP-Promotors erfolgen müsste (siehe Position der Bande im Vergleich zur Sequenz, Kap. 3.1.4, Abb. 18). Da die wildtypische Sequenz CTTG an derselben Stelle aufgrund der schwächeren Bindung zwischen A-T im Vergleich zu G-C

theoretisch leichter aufzuschmelzen wäre, ist eine Initiation in GCGC der Mutante und keine Nutzung des potentiellen Promotors im Wildtyp unwahrscheinlich. Leider gelang es nicht, mittels 5'-RACE eine dem *primer extension*-Signal entsprechende Bande zu detektieren und anhand der Sequenz zu erfassen, ob die korrespondierende RNA ein primäres oder prozessiertes Transkript darstellt. Und auch in den *deep sequencing* Daten konnte an entsprechender Stelle weder eine Prozessierungsstelle in der -TEX-Probe noch eine angereicherte TSS in der +TEX-Probe beobachtet werden, was dafür spricht, dass es sich bei dem Signal um ein Artefakt handelte. Die *primer extension* Analysen zeigten, dass PEP schon in 3 d alten Keimlingen sehr aktiv das *rrn*-Operon transkribierte. Dennoch war die Keimung von Δ NEP/*rrn16* in den ersten drei Tagen verzögert war, was verdeutlichte, dass NEP in frühen Phasen der Chloroplastenreifung trotz der bereits vorhandenen PEP-abhängigen Expression tatsächlich notwendig für die Expression von *rrn16* ist. Dies korreliert mit bekannten Daten, die für Tabak und andere dikotyle Spezies erhalten wurden. Bei der ursprünglichen Kartierung der *rrn16*-Promotoren in Tabak wurde bereits gezeigt, dass NEP-initiierte Transkripte in Proplastid-haltigen BY2-Zellen stärker akkumulierten als in Chloroplasten aus grünen Blättern, und die NEP-Transkripte insgesamt nur schwache Signale lieferten (Vera und Sugiura, 1995). In *Arabidopsis* Wildtyppflanzen wurde die Akkumulation der am *rrn16*-NEP-Promotor Pc initiierten Transkripte in trockenen und feuchten Samen, sowie 2 d alten Keimlingen verglichen (Courtois *et al.*, 2007). Dabei wurde gezeigt, dass der Pc-Promotor zwischenzeitlich in der Phase des Aufsaugens der Flüssigkeit durch die Samen (definiert als Phase 0+) aktiviert wurde. Zwei Tage nach der Keimung war die Menge an Pc-initiierten Transkripten bereits wieder reduziert. Auch PEP-abhängige Transkripte wurden in diesen frühen Stadien der Keimung detektiert. Obwohl also PEP schon zu Beginn der Entwicklung Transkripte zur Verfügung stellt, wird *rrn16* sowohl in Tabak als auch *Arabidopsis* von NEP transkribiert, muss also eine besondere Funktion erfüllen. Demarsy *et al.* (2012) untersuchten schließlich, welcher der beiden Polymerasetypen wichtiger für die Transkription des *rrn*-Operons während der Keimung ist. Dabei wurde wiederum eine Akkumulation von Pc-Transkripten 1 d nach Beginn der Keimung festgestellt und ebenfalls eine starke Anreicherung PEP-initiierten Transkripten. Dies zeigte, dass *rrn16* zu den ersten Genen gehört, die während der Keimung von PEP transkribiert werden. Angesichts dieser Daten und des Umstandes, dass mittels dRNA-Seq innerhalb der plastidären Sequenz keine zusätzlichen, nur in der Mutante aktivierten TSSs gefunden wurden, entsteht insgesamt der Eindruck, dass NEP für die Transkription des *rrn*-Operons entbehrlich ist. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass nicht nur *rrn16*-Transkriptlevel von diesen beiden Promotoren

abhängen, sondern aufgrund der Operonstruktur auch *rrn23*, *rrn4,5*, *rrn5* sowie die tRNAs *trnI* und *trnA* beeinflusst werden. Somit müssten auch diese Transkripte untersucht und mit *rrn16* verglichen werden. Zwar wurden in der Mutante für *rrn16* die bekannten Prozessierungsstellen detektiert, dennoch kann für die nachgeschalteten Gene nicht ausgeschlossen werden, dass der genutzte Polymerasetyp in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium Einfluss auf die Prozessierung und Transkriptstabilität hat. Krause *et al.* (2000) stellten in ihren Studien zum Beispiel fest, dass das Fehlen von PEP scheinbar zu einer Beeinträchtigung der Prozessierung bestimmter Primärtranskripte führte. Denkbar für *rrn16* wäre, dass beispielsweise NEP-abhängige Transkripte nur schwer detektierbar sind, weil sie durch die Beteiligung alternativer Prozessierungsmechanismen in frühen Entwicklungsstadien schneller umgesetzt werden und so schneller die Komponenten für die Expressionsmaschinerie und den Photosyntheseapparat bereit stellen. Dies ist insofern nicht abwegig, da die Mechanismen der Prozessierung plastidärer, polycistronischer RNAs komplex und noch nicht für alle Gene exakt aufgeschlüsselt sind. Unterschiedliche Proteine wie beispielsweise PPR-Proteine und auch verschiedenartige Ribonucleasen können an den posttranskriptionalen Prozessen beteiligt sein (Übersichten in Barkan, 2011; Monde *et al.*, 2000). Für die Reifung von bakterieller rRNA wird beispielsweise RNase E eine wichtige Rolle zugeschrieben (Cohen und McDowall, 1997; Coburn *et al.*, 1999). Homologe Proteine wurden z. B. für Spinat (Hayes *et al.*, 1996) und *Synechocystis* (Kaberdin *et al.*, 1998) gefunden.

4.1.3 Ist die Transkription des *rrn*-Operons teilweise lichtreguliert?

Ein weiterer interessanter Aspekt war, dass die Menge PEP-initiiertter Transkripte bei Anzucht für 7 d im Dunkeln im Vergleich zu im Licht angezogenen Pflanzen abnahm. Dieser Effekt wurde sowohl im Wildtyp als auch in Δ NEP/*rrn16* beobachtet und deutet darauf hin, dass das *rrn*-Operon teilweise lichtreguliert wird. Suzuki *et al.* (2003) identifizierten in Deletionsstudien direkt stromaufwärts des -35-Motivs von *Prrn16*-113/114 das RUA-Element GTGGGA, welches im Promotorkonstrukt für Δ NEP/*rrn16* intakt war. Es wurde postuliert, dass die Interaktion zwischen der -10-Region und einem Sigma-Faktor vermutlich teilweise ersetzt wird durch die direkte Interaktion von PEP mit RUA oder durch Interaktion von PEP mit einem RUA-bindenden Faktor (Suzuki *et al.*, 2003). Ein solches regulatorisches Element bietet theoretisch die Plattform für eine lichtabhängige Regulation. Der PEP-Promotor BLRP (*blue light-responsive promoter*) des *psbD/C*-Operons in Tabak besitzt stromaufwärts eine AAG- und eine PGT-Box. Diesen Elementen wurde eine Rolle bei der lichtaktivierten

Transkription zugeschrieben (Allison und Maliga, 1995). Allerdings wurde in anderen Studien gezeigt, dass diese Elemente und ihre bisher bekannten, interagierenden Faktoren (AGF und PGTF) nicht für die lichtabhängige Aktivierung benötigt werden (Satoh *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999a; Thum *et al.*, 2001). Dennoch ist eine Beteiligung an der lichtabhängigen Regulation denkbar. Kim *et al.* (1999a) vermuteten anhand ihrer Daten, dass die ADP-abhängige Phosphorylierung von PGTF oder assoziierten Faktoren die Bindung an den Promotor hemmt und die Transkription reduziert. Diese Phosphorylierung nimmt möglicherweise in Dunkelheit zu, parallel zu den ADP-Mengen in Plastiden. Auch das RUA-Element könnte eine Bindestelle für lichtaktivierte Transkriptionsfaktoren sein und somit der PEP-Promotor von *rrn16* lichtreguliert. Natürlich könnte die Verringerung der PEP-initiierten *rrn16*-Transkripte im Dunkeln auch ein sekundärer Effekt sein, welcher aus einer in Dunkelheit verringerten PEP-Menge bzw. –Aktivität resultierte. Einerseits könnten die *core* Untereinheiten von PEP direkt lichtreguliert sein. Liliana Borsellino zeigte in ihrer Dissertation, dass die Transkription von *rpoB* durch Licht leicht aktiviert wird (Borsellino, 2012). Andererseits könnte die PEP-Menge indirekt durch Licht beeinflusst werden. Es wurde postuliert, dass Licht die plastidäre Genexpression über den physiologischen Status der Plastiden wie z.B. die Redoxbedingungen kontrollieren kann (Link, 2003; Pfannschmidt und Liere, 2005). Fey *et al.* (2005) beobachteten mittels *microarrays* einen Einfluss auf *steady state* Transkriptlevel von *rpoB* durch veränderte Redoxbedingungen. Wenn Dunkelheit also zur verringerten *rpoB*-Transkriptakkumulation und damit zu geringeren Mengen von PEP führt, werden auch *rrn16*-Transkripte reduziert. Dies setzt jedoch voraus, dass geringere *rpoB*-Transkriptmengen tatsächlich in weniger PEP resultieren. Allerdings zeigten verschiedene Versuche der vorliegenden Arbeit, dass dies nicht der Fall sein muss. In den transplastomischen *rpoB*-Tabakmutanten waren die Transkriptmengen von *rpoB* gegenüber dem Wildtyp verringert, während sich die Proteinmenge jedoch nicht änderte (s. Kap. 3.1.5.3 und 3.1.7). Außerdem wurde in den RpoTp-überexprimierenden *Arabidopsis*-Mutanten zwar eine verstärkte Nutzung des *rpoB*-Promotors (s. Kap. 3.2.3.3), aber kein Einfluss auf die Proteinlevel der PEP-Untereinheiten RpoB und RpoA beobachtet. Schließlich ist auch möglich, dass nicht eine veränderte PEP-Menge sondern die lichtregulierte, veränderte Aktivität von PEP für eine geringere Transkriptakkumulation verantwortlich war. Die lichtaktivierte Dephosphorylierung von PEP *core* Untereinheiten und auch von Sigmafaktoren soll an der lichtinduzierten Aktivierung von PEP beteiligt sein (Tiller und Link, 1993; Baginsky *et al.*, 1997). Auch Komponenten des PEP-Komplexes wie beispielsweise pTAC3, welches in *Arabidopsis* lichtinduziert mit PEP assoziiert und einen essentiellen Bestandteil

des transkribierenden Komplexes darstellt (Yagi *et al.*, 2012), können im Dunkeln nicht ihre transkriptionsstimulierende oder –unterstützende Rolle übernehmen. Tatsächlich wurde in einer pTAC3-Insertionsmutante die verringerte Transkriptakkumulation ribosomaler RNAs inklusive *rrn16* beobachtet. In diesem Fall resultiert das *primer extension* Muster zwar aus der lichtabhängigen Regulation der PEP-Aktivität, dennoch zeigen die Auswirkungen auf *rrn16*-Transkripte eine indirekte Abhängigkeit der *rrn*-Transkription von Licht. Satoh *et al.* (1999) beobachteten in Gerste zwar keine Lichtabhängigkeit des 16S rRNA-Promotors, jedoch zeigten Chun *et al.* (2001) in transplastomischem Tabak eine Stimulation durch Blaulicht. Auch wenn 16S rRNA in allen Phasen der Plastidenentwicklung, auch in Dunkelheit, exprimiert wird (Baumgartner *et al.*, 1993; diese Arbeit), ist also unter bestimmten Bedingungen zumindest eine teilweise Stimulation der Transkription des *rrn*-Operons durch Licht denkbar.

4.1.4 Die Veränderung von *PaccD-129* führt zur Aktivierung alternativer Promotoren

Das Gen *accD* kodiert für die β -Untereinheit der plastidenlokalisierten Acetyl-CoA-Carboxylase und wird nach bisherigem Kenntnisstand in Dikotylen ausschließlich von einem NEP-Promotor aus transkribiert (Tabak: *PaccD-129*, Hajdukiewicz *et al.*, 1997). Liere und Maliga (1999b) stellten mittels *in vitro* Transkription fest, dass der Tabak-Promotor 19 bp (-17 bis +2) umfasste. Im transplastomischen Ansatz in dieser Arbeit wurde einerseits versucht, den *accD*-Promotor auszuschalten, indem das Motiv TATA durch Mutagenese zu GCGC, welches stark vom bekannten NEP-Konsensus YRTa abweicht, verändert wurde. Es resultierten die heteroplastomischen Linien Δ NEP/*accD* TL2 und TL21. Andererseits wurde der *accD*-Promotor durch den PEP-Promotor *PatpB-255* ersetzt, wobei das Motiv des *atpB*-NEP-Promotors *PatpB-289* durch Mutagenese von CATA zu GTAT ausgeschaltet wurde und 18 Nukleotide der 5'-UTR von *atpB* integriert wurden. Hierbei wurde die homoplastomische Linie PEP/*accD* TL2 erzeugt.

Bei Anzucht der Linien Δ NEP/*accD* TL2 und TL21 auf MS-Medium und auf Erde war zu Beginn der Keimung kein Unterschied zum Tabak-Wildtyp erkennbar. 5 bis 7 d nach Aussaat wurde deutlich, dass die transplastomischen Linien in ihrer Entwicklung verzögert waren. Nach 7 d waren Keimlinge der Mutanten etwa halb so groß wie die Wildtyp-Keimlinge. Der Wachstumsunterschied war nach 14 d nicht mehr zu beobachten. Offenbar konnte PEP die fehlende NEP-abhängige Transkription von *accD* in den ersten zwei Wochen nicht vollständig kompensieren. Mit verschiedenen Oligonukleotiden durchgeführte *primer extension* Analysen (s. Kap. 3.1.4, Abb. 16) wiesen nach, dass der NEP-Promotor in

Δ NEP/*accD* TL2 und TL21 tatsächlich nicht genutzt wurde. Da die Veränderung des YRTa-Motivs zu einem Ausschalten des *accD*-Promotors führte, konnte in diesen Studien die funktionelle Signifikanz des Motivs *in vivo* gezeigt werden. Auch die aufgrund der Heteroplastomie verbliebenen Wildtyp-Plastome resultierten nicht in wildtypischen Signalen, was verdeutlichte, dass der Großteil der Plastome in den transplastomischen Linien durch Transplastome repräsentiert wurde. Da allgemein angenommen wird, dass ein Ausschalten von *accD* letal ist (Kode *et al.*, 2005), musste trotz Deletion des Promotors *accD* dennoch in den Mutanten exprimiert werden. Entsprechende, an *PaccD*-129 der verbliebenen Wildtyp-Plastome initiierte Transkripte konnten nicht durch *primer extension* Analysen nachgewiesen werden, da vermutlich deren Abundanz für den Nachweis mit dieser Methode zu gering war. Denn bereits wildtypische Transkriptmengen lieferten nur schwache Signale. Jedoch zeigten *Northern Blots* mit 7, 10 und 14 d alten Pflanzen (s. Kap. 3.1.5.2, Abb. 20) annähernd wildtypische mRNA-Mengen in Δ NEP/*accD*. Dies konnte durch qRT-PCR mit 7 d alten Keimlingen bestätigt werden (s. Kap. 3.1.5.2, Abb. 21). Auch auf Proteinebene wurde beobachtet, dass die AccD-Mengen in 3 bis 21 d alten Pflanzen ebenfalls den Mengen im Wildtyp entsprachen. Nur in 7 d alten Keimlingen war eine leichte Verringerung in der Mutante erkennbar. Diese leicht verringerten Transkriptmengen korrelierten mit der Entwicklungsverzögerung in den ersten 10 d nach Aussaat, was die Wichtigkeit des NEP-Promotors zu Beginn der Chloroplastenreifung demonstriert. Teilweise konnten die *accD*-Transkripte in Δ NEP/*accD* bzw. die resultierenden Proteinmengen vermutlich auf die restlichen Wildtyp-Plastome zurückgeführt werden. Da diese aber deutlich unterrepräsentiert waren, war es unwahrscheinlich, dass sie allein für die nahezu wildtypischen Transkriptmengen in der Mutante verantwortlich waren. Somit wurde die Frage aufgeworfen, was der Ursprung dieser Transkripte war. Der *psbA*-Promotor *PpsbA*-85, welcher die Expression der *aadA*-Kassette in entgegengesetzter Richtung zur Transkriptionsrichtung der untersuchten Gene antreibt, kann theoretisch divergent genutzt werden (Sriraman *et al.*, 1998a). Somit könnten *accD*-Transkripte aus einer Transkriptionsinitiation in der Kassette resultieren. Daher wurden *primer extension* Analysen mit Oligonukleotiden durchgeführt, die weiter stromaufwärts der ursprünglichen *primer* hybridisierten, um derartige Transkripte zu detektieren. Es konnten keine Startstellen innerhalb der Kassettensequenz detektiert werden. Daraus folgte, dass die *accD*-Transkripte in den Mutanten eher nicht auf eine Transkriptionsinitiation in der Kassette zurückgingen. Des Weiteren wurde ein *primer* verwendet, der innerhalb der Kassette hybridisierte, um potentielle Initiationsstellen zu identifizieren, die stromaufwärts der Kassettensequenz lagen und bisher unbekannte *accD*-

Promotoren repräsentierten. Auch in diesen Analysen konnten keine Signale detektiert werden. Da nicht hundertprozentig ausgeschlossen werden konnte, dass trotz mehrfacher Wiederholung die *primer extension* Reaktionen nicht optimal funktionierten und daher keine Transkriptionsstarts gefunden wurden, wurde zur weiteren Klärung das primäre, plastidäre Transkriptom 7 d alter Mutanten mittels *deep sequencing* analysiert. Dabei wurde gezeigt, dass innerhalb der Kasette offenbar TSSs aktiviert werden. Eine dieser Startstellen (*TaadA1*) wurde in allen transplastomischen Pflanzen beobachtet. Stromaufwärts befindet sich ein Motiv, das theoretisch von PEP als Promotor genutzt werden könnte. Allerdings weicht insbesondere die potentielle -35-Box (TAGCAC) deutlich vom Konsensus (TTGaca) ab, sodass dieser „Promotor“, wenn überhaupt, nur schwach genutzt werden sollte. Zwei weiteren TSSs in Δ NEP/*accD* TL2 (*TaadA2* und 3) sind keinerlei Motive vorgeschaltet, die von PEP oder NEP als Promotor erkannt werden könnten. Schließlich befindet sich vor der TSS *TaadA4* in Δ NEP/*accD* TL2 ein potentielles PEP-Promotormotiv, dessen -10- und -35-Box allerdings sehr GC-reich sind, sodass auch dieser „Promotor“ eher schwach wäre. Die in der Kasette gefundenen Startstellen deuten also auf eine teilweise Transkriptionsinitiation hin, allerdings nicht auf eine effiziente Transkription, die die wildtypischen Transkriptmengen in der Mutante erklären würde. Wenig stromaufwärts des ausgeschalteten *PaccD*-129 wurde in Δ NEP/*accD* TL2 eine TSS (*TaccD*-158) detektiert, welche auch im Wildtyp gefunden wurde und zudem als sehr schwaches Signal ebenso in den ursprünglichen *primer extension* Analysen beobachtet wurde. Da auch in anderen Tabak-Wildtypproben diese Startstelle gefunden wurde (Dr. Petya Zhelyazkova, pers. Mitteilung), handelt es sich offenbar um einen bisher unbekannten *accD*-Promotor (s. 4.1.6, Abb. 53, ii). Die Suche nach möglichen Promotormotiven ergab zum Einen zwei potentielle NEP-Motive, von denen das dem YRTa-Konsensus nähere Motiv TATA nur zwei Nukleotide stromaufwärts der TSS liegt, während das andere (TAAT) mit einem Abstand von 5 Nukleotiden zur TSS etwas wahrscheinlicher ist. Zum anderen konnten zwei potentielle -10 Regionen gefunden werden. Die korrespondierenden, potentiellen -35 Motive enthalten ausschließlich Ts und As, was deutlich vom Konsensus abweicht und den Promotor eher zu einem schwachen Promotor machen würde. Aufgrund der schwach konservierten -35-Boxen und der schwachen *primer extension* Bande dieser Startstelle ist ein NEP-Promotor am wahrscheinlichsten (s. 4.1.6, Abb. 53, ii). Direkt stromaufwärts der Kasette war sowohl in Wildtyp als auch *accD*-Mutanten ein Signal in den -TEX-Proben angereichert, welches vermutlich eine Bindestelle für ein RNA-bindendes Protein repräsentiert. Zhelyazkova *et al.* (2012a) detektierten in ihren Studien die Bindestellen von PPR-Proteinen als kleine RNAs. Daher könnte es sich laut persönlicher

Mitteilung durch Dr. Zhelyazkova auch bei der hier gefundenen kleinen RNA um den *footprint* eines RNA-bindenden Proteins handeln. Des Weiteren wurden stromaufwärts der *aadA*-Kassette *TaccD*-557 und *TaccD*-374 aktiviert, wobei ersterer TSS ein mögliches PEP-Motiv vorgeschaltet ist und der zweiten ein schwacher PEP-Promotor bzw. ein NEP-Promotormotiv (s. 4.1.6, Abb. 53, iii und iv). Zwar liegen die gefundenen TSS mehrere 100 bp stromaufwärts des Translationsstarts, jedoch ist für Plastiden bekannt, dass auch weit entfernte Promotoren genutzt werden (s. z.B. Tabak *Pycf2*-1577, Hajdukiewicz *et al.*, 1997; Tabak *PatpB*-611, Orozco *et al.*, 1990). Somit erklären die zusätzlich aktivierten TSS höchstwahrscheinlich die annähernd wildtypischen Transkriptlevel in Δ NEP/*accD*. Damit wird deutlich, dass auch im Wildtyp alternative Promotoren die Transkription von *accD* antreiben und möglicherweise auch PEP an der Transkription dieses Haushaltsgens beteiligt sein könnte. Eine Verifizierung der alternativen Promotoren durch beispielsweise 5'-RACE steht noch aus.

Die Anzucht der homoplastomischen Linie PEP/*accD* TL2 auf Erde und auch MS-Medium zeigte keine Unterschiede in der Entwicklung zum Wildtyp. In den *primer extension* Analysen (s. Kap. 3.1.4, Abb. 16) und auch mittels 5'-RACE wurde in der Mutante das erwartete, dem PEP-Promotor entsprechende, primäre Transkriptende detektiert. Die *primer extension* Signale für den Wildtyp und die Mutante deuteten auf ein ähnliches Expressionsmuster hin. In 7 d alten Keimlingen war die Promotornutzung jeweils am stärksten und nahm anschließend im Wildtyp ab, während die Transkriptmengen in der transplastomischen Linie noch bis 14 d nach Aussaat auf einem ähnlichen Level blieben. Außerdem waren die Signale in PEP/*accD* kräftiger als im Wildtyp. Demnach wurde der PEP-Promotor zu den jeweiligen Zeitpunkten stärker genutzt als der ursprüngliche NEP-Promotor, was auf eine leichte Überexpression hindeutete. Diese konnte durch *Northern Blots* (s. Kap. 3.1.5.2, Abb. 20) bestätigt werden. Dabei wurden erhöhte Transkriptmengen in PEP/*accD* gegenüber dem Wildtyp in 10 und 14 d alten Pflanzen, nicht jedoch in 7 d alten Keimlingen beobachtet. Weder mittels *primer extension* noch durch *Northern Blots* konnten *accD*-Transkripte in 3 d alten Keimlingen detektiert werden, was vermutlich auf die sehr geringe Abundanz der entsprechenden RNAs zurückzuführen war. Die Transkriptmengen von *accD* sind typischerweise zu allen Entwicklungszeitpunkten niedrig. In *Arabidopsis* wurde gezeigt, dass *accD*-Transkripte 1 d nach Beginn der Keimung nachweisbar waren, jedoch in allen untersuchten Phasen der Keimung und Chloroplastendifferenzierung in sehr niedrigen Mengen vorlagen (Demarsy *et al.*, 2012). Im Wildtyp waren somit die Transkriptmengen vermutlich zu gering für einen Nachweis. Selbst die Transkription durch PEP statt durch NEP in der Mutante ermöglichte

ebenfalls keine Detektion in 3 d alten Pflanzen. Aufgrund der höheren Sensitivität wurden daher qRT-PCRs (s. Kap. 3.1.5.2, Abb. 21) zur Detektion der *accD*-Transkriptmengen durchgeführt. Diese Versuche zeigten, dass in 3 d alten Pflanzen die Transkriptmengen in Mutante und Wildtyp annähernd gleich waren, also keine verstärkte Expression durch PEP in PEP/*accD* erfolgte. Außerdem wurde das in den *primer extension* Analysen gezeigte Expressionsmuster bestätigt. In 7 d alten Keimlingen des Wildtyps war die Expression am stärksten und nahm dann ab. Auch in PEP/*accD* TL2 wurde das Expressionsmaximum nach 7 d erreicht. Anders als im *Northern Blot* wurden bereits zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung in der Mutante gegenüber dem Wildtyp erhöhte Transkriptmengen detektiert. Diese Überexpression wurde bis 14 d nach Aussaat beobachtet. Bereits nach 21 d waren die Transkriptlevel in Wildtyp und transplastomischer Linie wieder annähernd gleich. Es ist zu beachten, dass für die Darstellung der qRT-PCR-Daten von PEP/*accD*, und auch von Δ NEP/*accD* und PEP/*rpoB*, jeweils nur zwei der drei biologischen Replikate verrechnet wurden. Dies hängt damit zusammen, dass sich die Verhältnisse zwischen Wildtyp- und Mutanten- C_T -Werten in einem der drei Versuche so unterschieden, dass die Standardabweichungen bei Verrechnung aller technischen Replikate sehr groß und nicht mehr aussagekräftig waren. Daher wurde dieser Datensatz als Ausreißer deklariert und zur Auswertung die zwei biologischen Replikate herangezogen, deren C_T -Wert-Verhältnisse sich am meisten glichen. Da darüber hinaus die Expressionsmuster aller technischen Replikate und damit die Grundaussagen der erhaltenen Daten stets identisch waren, können die sich daraus ergebenden Schlussfolgerungen als durchaus valide angesehen werden. Zwar kann mit diesem Datensatz keine Aussage bezüglich exakter Verhältnisse zwischen Wildtyp- und Mutantenexpression erreicht werden, aber insgesamt sind die qRT-PCR-Daten zuverlässig. Die 11 goldenen Regeln der quantitativen RT-PCR (Udvardi *et al.*, 2008) wurden eingehalten. Lediglich die empfohlene Verwendung mehrerer Referenzgene und die Überprüfung deren Expressionsstabilität (Czechowski *et al.*, 2005) wurde nicht durchgeführt, sondern standardmäßig UBQ als Referenz genutzt. Die Analyse des primären Transkriptoms von PEP/*accD* zeigte, dass innerhalb der Kassette wie in den anderen transplastomischen Linien *TaadA1* aktiviert wurde. Wie schon für Δ NEP/*accD* beschrieben, sollte der entsprechende Bereich theoretisch nur schwach durch PEP transkribiert werden. Stromaufwärts von *accD* konnte keine zum *atpB*-PEP-Promotor korrespondierende TSS detektiert werden, obwohl das entsprechende primäre Transkript in den *primer extension* Analysen stets gefunden wurde. Auch in PEP/*accD* wurde *TaccD-557* aktiviert (s. 4.1.6, Abb. 53, iii). Dies veranschaulicht, dass der *accD*-NEP-Promotor nicht ohne Weiteres ersetzt werden kann, und sein Fehlen durch

Aktivierung alternativer Promotoren kompensiert wird. Natürlich müssen die verschiedenen, alternativen TSS zukünftig durch weitere Methoden wie 5'-RACE verifiziert werden. Schließlich wurde untersucht, ob die durch die *primer extension* Analysen, die *Northern Blot* Hybridisierungen und auch die qRT-PCR-Versuche gezeigte Überexpression in PEP/*accD* TL2 auf Protein-Ebene widergespiegelt wird (s. Kap. 3.1.7). In 10 und 14 d alten Pflanzen konnte in der Mutante eine leichte Erhöhung der AccD-Proteinmenge detektiert werden, während 3 und 21 d nach Aussaat keine Unterschiede zum Wildtyp beobachtet wurden. Diese Daten korrelieren mit den zuvor beobachteten Veränderungen der Transkriptmengen. Dass die Transkription von *accD* durch PEP statt durch NEP zu einer leichten Überexpression führte, wurde auch durch Madoka *et al.* (2002) bestätigt. Es wurde in einem transplastomischen Ansatz gezielt versucht, eine Überexpression von *accD* durch die Transkription vom *rrn16* PEP-Promotor zu erzielen. Madoka *et al.* (2002) beobachteten sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene eine Erhöhung der Transkriptlevel bzw. AccD-Menge in den transplastomischen Linien. In diesen Versuchen gelang die Erzeugung einer Kontrollpflanze, in welcher lediglich die Resistenzkassette stromaufwärts des *accD*-Promotors inseriert war. Zwar wurde in dieser Kontrolle auf Transkriptebeene ebenfalls eine minimale Verstärkung der detektierten *accD*-Signale gezeigt, allerdings konnte dies darauf zurückgeführt werden, dass die Kassette in derselben Richtung wie *accD* transkribiert wurde, und es vermutlich zu einem geringfügigem Durchlesen kam. Somit wurde gezeigt, dass die *aadA*-Kassette stromaufwärts von *accD* keinen signifikanten Effekt auf die Expression hatte. Die Kassette in diesen Experimenten lag um 139 bp näher am *accD*-Promotor als die Kassette in der vorliegenden Arbeit. Zudem wurde in den hier verwendeten Pflanzen die Kassette in entgegengesetzter Richtung transkribiert. Daher sind die Experimente von Madoka *et al.* (2002) ein weiteres Argument dafür, dass die *aadA*-Kassette in den hier gezeigten Versuchen keinen signifikanten Einfluss auf die *accD*-Expression haben sollte. Eine verzögerte Seneszenz sowie eine erhöhte Menge an produzierten Samen in den transplastomischen Linien, wie Madoka *et al.* (2002) beobachteten, wurden in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt.

4.1.5 PEP kann die Transkription von *rpoB* durch NEP nicht vollständig ersetzen

Das *rpoB/C1/C2* Operon kodiert für drei Untereinheiten der plastidären, eubakterientypischen RNA-Polymerase und wird von einem NEP-Promotor (*PrpoB*-345) aus transkribiert, welcher die Nukleotide -14 bis +1 relativ zur Transkriptionsinitiationsstelle umfasst und das *core*-Motiv CAT aufweist (Liere und Maliga, 1999a). Im transplastomischen Ansatz der vorliegenden Arbeit wurde der NEP-Promotor durch den PEP-Promotor *PatpB*-255 ersetzt, wobei das Motiv des NEP-Promotors *PatpB*-289 durch Mutagenese von CATA zu GTAT

ausgeschaltet wurde, und 14 Nukleotide der 5'-UTR von *atpB* integriert wurden. Es wurden die heteroplastomischen Linien PEP/*rpoB* TL2 und TL21 erzeugt.

Bei der Anzucht der transplastomischen Linien PEP/*rpoB* TL2 und TL21 auf MS-Medium (s. Kap. 3.1.3, Abb. 14B) bzw. auf Erde wurde schon im Verlauf der Keimung deutlich, dass die Entwicklung der Mutanten leicht verzögert war. In den ersten 10 d nach Aussaat waren die transplastomischen Keimlinge kleiner als die Wildtyp-Keimlinge. Danach war kein Entwicklungsunterschied mehr erkennbar. Schon der makroskopische Phänotyp deutete also darauf hin, dass die Transkription des *rpoB/C1/C2*-Operons durch NEP während der Keimung und der ersten Phasen der Chloroplastenreifung nicht vollständig durch eine PEP-abhängige Transkription ersetzt werden kann. In den *primer extension* Analysen (s. Kap. 3.1.4, Abb. 17) wurde keine verstärkte oder abgeschwächte Promotornutzung in den transplastomischen Pflanzen gegenüber dem Wildtyp beobachtet. Auch die Expressionsmuster von Mutanten und Wildtyp glichen sich. Nach 3 d konnte kein bzw. nur ein sehr schwaches Signal detektiert werden. Das Expressionsmaximum wurde zwischen 7 und 14 d nach Aussaat erreicht. Auch die qRT-PCRs mit RNA des Wildtyps und von PEP/*rpoB* TL2 (s. Kap. 3.1.5.3) zeigten ein übereinstimmendes Expressionsmuster. Im Gegensatz zu den *primer extension* Analysen wurde jedoch das Expressionsmaximum 3 d nach Aussaat beobachtet. Einerseits wurde durch vergangene Studien bereits gezeigt, dass die Expression von *rpoB* in sehr frühen Phasen der Chloroplastenentwicklung signifikant erhöht war. Sowohl die mRNA-Menge als auch die Transkriptionsrate waren in jungen Blattsektionen 4 d dunkelangezogener Gerste maximal (Baumgartner *et al.*, 1993). Auch in unreifen Reisblättern, in denen die Chloroplasten noch nicht differenziert waren, war die *rpoB*-Expression am höchsten verglichen mit reifen Blättern (Inada *et al.*, 1996). Zudem zeigten Demarsy *et al.* (2006) für Spinat und *Arabidopsis*, dass *rpoB* mRNA innerhalb der ersten 2 d nach der Keimung akkumuliert. Andererseits konnten die mittels qRT-PCR detektierten Transkripte in 3 d alten Keimlingen nicht mittels *primer extension* detektiert werden. Daher könnte es sich teilweise auch um Artefakte handeln. In trockenen Samen von Spinat und *Arabidopsis* lagen bereits *rpoB*-Transkripte vor (Demarsy *et al.*, 2006). In Tabak könnten derartige Vorräte zwar die tatsächlich produzierten Transkripte ergänzen, was die große Menge in der qRT-PCR erklärt. Möglicherweise handelte es sich aber bei diesen vorrätigen Transkripten nicht nur um intakte Moleküle, sondern auch teilweise abgebaute RNAs. Diese konnten wiederum in den *primer extension* Analysen nicht detektiert werden, da vermutlich entweder das native 5'-Ende fehlte oder der RNA-Anteil, in dem der *primer* für die *primer extension* Reaktion hybridisierte. Das qRT-PCR-Oligonukleotid dagegen konnte hybridisieren, da die entsprechende Sequenz weiter stromaufwärts liegt als

diejenige des *primer extension* Oligonukleotids. Obwohl in den *primer extensions* keine veränderte Promotornutzung beobachtet wurde, waren in der qRT-PCR die relativen Transkriptmengen in PEP/*rpoB* TL2 3 bis 14 nach Aussaat gegenüber dem Wildtyp verringert. Anders als bei PEP/*accD* führte die Nutzung des PEP-Promotors anstelle des NEP-Promotors nicht zu einer Überexpression, sondern im Gegenteil zur Reduzierung der Transkriptmenge. Demnach konnte PEP in den frühen Phasen der Chloroplastendifferenzierung die NEP-abhängige Transkription des *rpoB*-Operons nicht vollständig ersetzen, was mit der beim makroskopischen Phänotyp beobachteten Entwicklungsverzögerung korrelierte. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass eventuell durch die Insertion der Kasette und den Ersatz von Originalsequenzen durch *PatpB*-255 bisher unbekannte Promotoren und/oder regulatorische Sequenzen zerstört oder behindert wurden. Dann würde eine verringerte Transkriptmenge in PEP/*rpoB* nicht auf eine schwache Aktivität von PEP bei der Transkription zurückgehen, sondern darauf, dass weniger Startstellen genutzt werden als im Wildtyp. Tatsächlich identifizierten Inada *et al.* (1997) in *Arabidopsis* drei auch in Spinat und Tabak konservierte Motive, von denen Motiv I für die Transkriptionsinitiation durch NEP benötigt wurde und in PEP/*rpoB* fehlte, und Motiv II und III durch die Kasette weiter stromaufwärts lagen. Allerdings sollte die PEP-abhängige Transkription in der Mutante theoretisch nicht auf die NEP-Elemente angewiesen sein. Außerdem wurden in vorangegangenen Arbeiten, beispielsweise durch Dr. Stefanie Hertel oder Dr. Julia Legen im Rahmen ihrer Dissertationen (Legen, 2002; Hertel, 2009), mehrere zusätzliche TSSs stromaufwärts von *rpoB* beobachtet. Beispielsweise wurde die Transkriptinitiation an der Position -558 relativ zum Translationsstart beobachtet (Hertel, 2009), welche in PEP/*rpoB* durch den Austausch nicht vorhanden ist. Auch für PEP/*rpoB* TL2 und TL21 wurden zusätzliche *primer extension* Analysen durchgeführt mit Oligonukleotiden, die weiter stromaufwärts hybridisierten, um Transkripte zu identifizieren, die innerhalb der Kassettensequenz initiiert wurden bzw. stromaufwärts der Kasette und somit alternative Promotoren repräsentierten. Trotz mehrfacher Wiederholung wurden entsprechende Startstellen mit dieser Methode nicht gefunden. Die Analyse des primären, plastidären Transkriptoms in 7 d alten Pflanzen mittels dRNA-Seq hingegen zeigte, dass stromaufwärts der Kassettensequenz in PEP/*rpoB*, jedoch nicht im Wildtyp, eine bisher unbekannte TSS aktiviert wird (*TrpoB*-608). Diesem, primären Transkript ist mit CGTG ein potentielles NEP-Promotormotiv vorgeschaltet (s. 4.1.6, Abb. 53, v und vi). Eine entsprechende Startstelle wurde durch Dr. Hertel und Dr. Legen nicht gefunden, lediglich *primer extension* Signale stromabwärts (-580) und stromaufwärts (-611), die eher auf prozessierte Transkripte

zurückgeführt wurden. Die Aktivierung eines alternativen Promotors, die verringerten Transkriptlevel und auch die phänotypischen Effekte zeigen, dass PEP im Fall des *rpoB*-Operons zumindest in den frühen Phasen der Entwicklung die Transkription durch NEP nicht vollständig ersetzen kann. Interessanterweise wurden auf Proteinebene (s. Kap. 3.1.7) keine Unterschiede der RpoB-Menge zwischen Wildtyp und Mutanten gefunden. Dementsprechend wurden auch für die mittels *Northern Blot* untersuchten RNA-Mengen der durch PEP transkribierten Gene *psbA*, *psbD* und *psbE* (s. Kap. 3.1.5.3, Abb. 23) keine Effekte beobachtet. Die Verringerung der *rpoB*-Transkriptmenge in PEP/*rpoB* wurde also im Zuge posttranskriptionaler Prozesse, der Translation und/oder posttranslationaler Ereignisse ausgeglichen, sodass sich die Menge und Transkriptionsaktivität von PEP im Chloroplasten nicht änderte. Demnach würde die beobachtete Entwicklungsverzögerung der *rpoB*-Mutanten entweder allein auf die verringerten *rpoB*-Transkriptmengen zurückgehen oder auf Effekte, die bisher nicht erfasst wurden.

4.1.6 Der Polymerasetyp hat keinen wesentlichen Einfluss auf die 5'-Prozessierung

Dass trotz verringerter *rpoB*-Transkriptmengen die Proteinlevel von PEP/*rpoB* denen des Wildtyps entsprechen, könnte einerseits darauf hindeuten, dass der jeweils transkribierende Polymerasetyp tatsächlich die Rate und Qualität der nachfolgenden Prozessierungsprozesse und/oder der Translation beeinflusst. Hinweise darauf wurden schon durch Krause *et al.* (2000) und Legen *et al.* (2002) erhalten, die feststellten, dass die *steady state* Transkriptlevel bestimmter Gene nicht mit ihren Transkriptionsraten korrelierten. In Abwesenheit von PEP schien die Prozessierung von Primärtranskripten vermindert (Krause *et al.*, 2000). Möglicherweise sind die PEP-generierten *rpoB*-Transkripte stabiler als die durch NEP erzeugten und werden daher effizienter oder länger translatiert, sodass letztendlich trotz weniger RNA gleiche Mengen Protein produziert werden können. Tatsächlich sind derartige, unterschiedliche Transkriptstabilitäten bzw. Abbauraten denkbar, da diese z.B. durch cis-Elemente und Sekundärstrukturen in den 5'- und 3'-UTRs moduliert werden können (Hayes *et al.*, 1999; Schuster *et al.*, 1999), und auch durch die Interaktion der jeweiligen Polymerase mit unterschiedlichen Prozessierungsfaktoren. Andererseits wurde die Edierung der *rpoB*-Transkripte nicht beeinflusst in PEP/*rpoB*, und die dRNA-Seq Daten beweisen, dass sich die 5'-Prozessierungsstelle nicht in Abhängigkeit vom Polymerasetyp verändert. Dies wurde für sämtliche transplastomische Pflanzen beobachtet und auch in der Gerstenmutante *albostrans* (Dr. Zhelyazkova, pers. Mitteilung). Insbesondere die Daten für Δ NEP/*rrn16* und die *accD*-Mutanten veranschaulichten zudem, dass auch die Menge an prozessierten Transkripten

offenbar nicht beeinflusst wird durch den Polymerasetyp und die Aktivierung alternativer Promotoren, denn die Anzahl kartierter *reads* über die jeweilige Sequenz der prozessierten RNAs war nahezu gleich in Wildtyp und transplastomischer Linie. Somit kann geschlussfolgert werden, dass der transkribierende Polymerasetyp keinen Einfluss auf die 5'-Prozessierungsstelle und höchstens einen teilweisen Einfluss auf die Prozessierungsrate hat. Ein Einfluss auf die Stabilität der Transkripte und somit die Translation scheint am wahrscheinlichsten, um die gezeigten Effekte zu erklären.

Das nachfolgende Modell fasst die für *accD* und *rpoB* gezogenen Schlussfolgerungen noch einmal zusammen (Abb. 53).

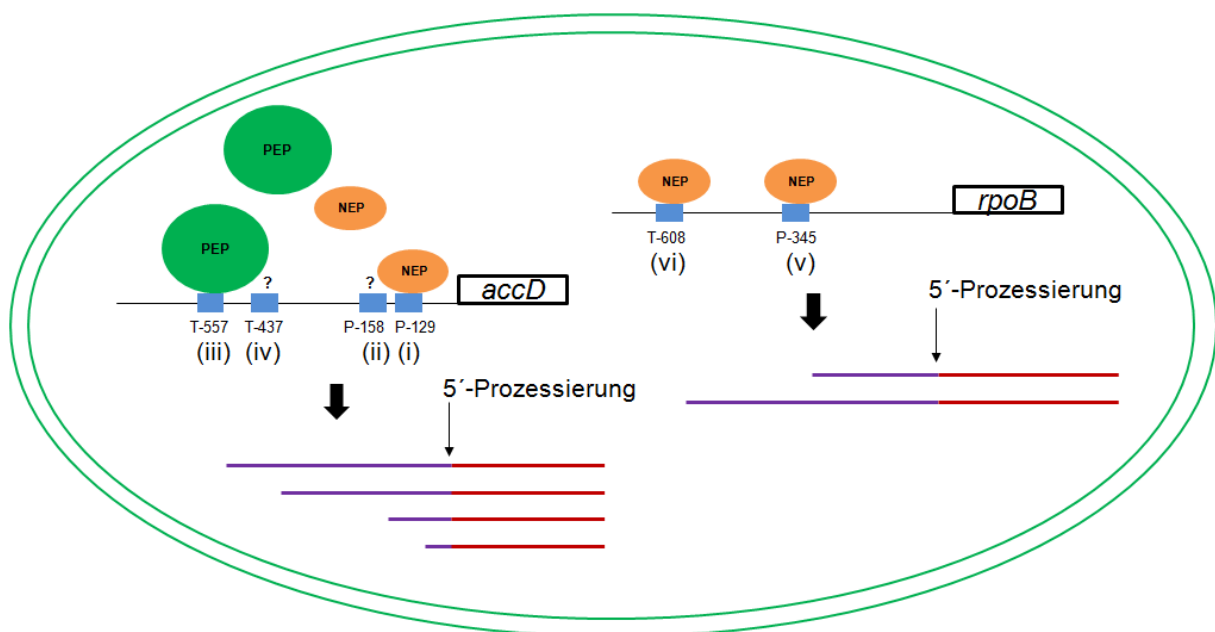


Abb. 53: Modell zur plastidären Transkription der Gene *accD* und *rpoB*. Blaue Kästen kennzeichnen Motive bekannter Promotoren und teilweise verifizierter, neuer Promotoren (P), bzw. in dieser Arbeit identifizierter, potentieller Transkriptionsstartstellen (T). Diese Motive werden von NEP (orange) oder PEP (grün) erkannt, wobei für einige Startstellen (?) die Erkennung durch beide Polymerasen möglich wäre. Die Transkription von *accD* wird an *PaccD*-129 durch NEP initiiert (i). Zusätzlich wird im Wildtyp eine weitere Startstelle an Position -158 relativ zum Translationsstart von PEP oder NEP genutzt (ii). Der Ersatz von *PaccD*-129 durch einen PEP-Promotor führte zur Aktivierung einer neuen TSS (iii), die vermutlich durch PEP genutzt wird, während das Ausschalten von *PaccD*-129 diese und noch eine weitere TSS (iv) aktivierte, deren vorgeschaltete Motive sowohl durch NEP als auch PEP erkannt werden könnten. Das Gen *rpoB* wird durch NEP transkribiert (v) und der Ersatz von *PrpoB*-345 durch einen PEP-Promotor führte zur Aktivierung einer neuen Startstelle (vi), deren vorgeschaltetes Motiv für eine Erkennung durch NEP spricht. Die aus der Nutzung unterschiedlicher Startstellen resultierenden primären Transkripte (zweifarbige Linien) werden offenbar unabhängig vom Polymerasetyp stets an derselben Stelle des 5'-Endes durch Nukleasen prozessiert. Lila = abgeschnittener RNA-Anteil, Rot = prozessiertes Transkript.

Unter Normalbedingungen wird das Haushaltsgen *accD* durch NEP transkribiert (i). Zudem wurde ein weiterer Promotor identifiziert (ii), der sowohl durch NEP als auch PEP genutzt werden könnte. Der Ersatz von *PaccD*-129 durch einen PEP-Promotor führte zur Aktivierung

einer neuen TSS (iii), die vermutlich durch PEP genutzt wird. Das Ausschalten von *PaccD*-129 aktivierte diese und noch eine weitere TSS (iv), die sowohl durch NEP als auch PEP genutzt werden könnte. Dies, sowie das verzögerte Wachstum der *knock out* Mutante veranschaulichte, dass die Transkription von *accD* durch NEP insbesondere zu frühen Zeitpunkten der Entwicklung wichtig ist und nicht ohne Weiteres durch PEP ersetzt werden kann. Im Fall von *rpoB* führte sogar der Ersatz des NEP-Promotors (v) durch einen PEP-Promotor bereits zum verzögerten Wachstum und verringerten Transkriptlevel, sowie zur Aktivierung einer neuen TSS (vi), die vermutlich von NEP genutzt wird. Die NEP-abhängige Transkription dieser beiden Gene ist also essentiell, und selbst in reifen Chloroplasten (7 d alten Keimlingen) nicht einfach ersetzbar. Zudem ist es möglich, dass auch PEP an der Transkription des Haushaltsgens *accD* beteiligt ist. Die Prozessierung am 5'-Ende primärer Transkripte bleibt dabei offenbar unbeeinflusst durch die genutzte Startstelle und den transkribierenden Polymerasetyp.

4.2 Suche nach potentiellen Transkriptionsfaktoren der RpoTs

Während für PEP bereits Faktoren wie die Sigmafaktoren bekannt sind, die an der spezifischen Promotorerkennung beteiligt sind (Übersichten in Allison, 2000; Liere und Börner, 2007; Lysenko, 2007; Schweer et al., 2010; Lerbs-Mache 2011), konnten für NEP bisher keine derartigen Spezifitätsfaktoren identifiziert und deren transkriptionsstimulierende oder –hemmende Rolle nachgewiesen werden. Die wie NEP aus einem einzelnen Polypeptid bestehende T7-RNA-Polymerase besitzt die intrinsische Fähigkeit zur Erkennung von Promotorsequenzen (Cheetham und Steitz, 2000). Auch *in vitro* Transkriptionsstudien mit den *Arabidopsis*-RpoTs zeigten, dass RpoTp und RpoTm an mitochondrialen und plastidären Promotoren ohne Co-Faktoren die Transkription initiierten (Kühn *et al.*, 2007). Die Transkription erfolgte jedoch nur an superhelikaler DNA und einige Promotoren wurden nicht erkannt. Außerdem wurde für RpoTmp keine signifikante Promotorspezifität gezeigt (Kühn *et al.*, 2007). Dies verdeutlichte, dass die Phagentyp-RNA-Polymerasen *in organello* höchstwahrscheinlich Transkriptionsfaktoren für die Promotorerkennung und Transkriptionsinitiation benötigen. Mittels Yeast 2-Hybrid-Analysen konnten keine mit *Arabidopsis*-RpoT-Polymerasen interagierenden Proteine identifiziert werden (Dr. Andreas Weihe, pers. Mitteilung). Daher wurde in dieser Arbeit versucht, potentielle Interaktionspartner der RpoTs zu identifizieren. Dafür wurden die Phagentyp-Polymerasen einerseits heterolog in *E. coli* exprimiert und für *pulldown assays* eingesetzt. Andererseits

wurden einige RpoTs sowohl in Tabak als auch in *Arabidopsis* mit verschiedenen Affinitäts-tags *in vivo* exprimiert und Co-Immunpräzipitationsversuche durchgeführt.

4.2.1 IP *in vivo* exprimierter, Epitop-markierter RpoTp in Tabak

Durch Dr. Karsten Liere (HU Berlin/Genetik) wurden Tabakpflanzen zur Verfügung gestellt, die RpoTp mit den Epitopen HA-FLAG-StrepII, VSV-cMyc-FLAG bzw. E2 exprimierten (s. Kap. 3.2.1). In den transgenen Linien HFS- und VMF-Tp konnte mittels *Western Blot* mit Anti-FLAG Antikörper die Expression der Epitop-markierten Polymerase im Stroma nachgewiesen werden. Dabei wurde im Wildtyp eine Bande um 120 kDa beobachtet, bei der es sich um eine falsch positive Kreuzreaktion handelte. Korrespondierend wurden in den Mutanten HFS- und VMF-Tp zwei Banden beobachtet, wobei die untere Bande um 110 kDa die *getaggte* RNA-Polymerase repräsentierte. Ein entsprechendes Muster wurde bereits durch Liere *et al.* (2004) mit 3xFLAG-RpoTp-exprimierenden Tabakpflanzen gezeigt. In HFS-Tp funktionierte auch die Detektion mit verschiedenen Anti-HA Antikörpern, die jeweils eine Bande um 110 kDa ergab, welche mit der vorhergesagten Größe von 105 kDa korrelierte. Es wurden keine Kreuzreaktionen im Wildtyp beobachtet. Mit einem cMyc-spezifischen Antikörper sowie Anti-StrepII wurden keine Signale erhalten. Möglicherweise war dies darauf zurückzuführen, dass die Antikörper nicht effizient genug mit den denaturierten Epitopen interagierten. Auch die E2-markierte RpoTp konnte nicht detektiert werden. Entweder war auch hier die Interaktion des Antikörpers mit dem denaturierten Protein nicht ausreichend oder die Expression der *getaggt*en Polymerase war zu gering. Für die weiteren Versuche wurden daher die transgenen Pflanzen HFS- und VMF-Tp genutzt. Die Auswahl der Linien wurde dabei mitbestimmt von den Ergebnissen der *primer extension* Analysen des Tabak NEP-Promotors *PatpB-329*, dessen verstärkte Nutzung in einigen Linien sowohl eine Überexpression der Epitop-markierten RpoTp als auch ihre Funktionalität und somit korrekte Faltung verdeutlichte. Trotz unterschiedlicher Ansätze mit verschiedenen Mengen des Stromas sowie unterschiedlichen Inkubationszeiten und -temperaturen, Sepharosemengen, Puffern und Elutionsmethoden, gelang eine Immunopräzipitation von HFS-RpoTp und VMF-RpoTp nicht. Da für die Herstellung der Antikörper denaturierte Peptide verwendet werden, sollte überprüft werden, ob eine IP von denaturiertem Protein möglich ist. Weder eine Denaturierung durch Hitze noch durch den Zusatz von Harnstoff ermöglichten im anschließenden IP-Versuch die Präzipitation der Polymerase. Möglicherweise war die Menge an exprimierter, Epitop-markierter Polymerase zu gering für eine effiziente Präzipitation. Entsprechend der theoretischen Vorhersage der Transitpeptidsequenz von RpoTp, die bei der

Klonierung der ursprünglichen Transformationsplasmide berücksichtigt wurde, liegen N-terminal vor den Epitopen einige Aminosäuren. Denkbar ist daher auch, dass die stabile Bindung zwischen dem Antikörper und dem jeweiligen Epitop durch die vor dem *tag* liegenden Aminosäuren behindert wurde. Versuche HFS-RpoTp mittels *crosslinking* durch DSP bzw. Formaldehyd kovalent an den Anti-FLAG Antikörper zu koppeln und so zu präzipitieren waren erfolglos (nicht gezeigt). Daher ist es ebenso möglich, dass durch den *tag* die Prozessierung des Transitpeptids verändert war und das Epitop bzw. Teile davon beim Import in die Plastiden abgeschnitten wurden. Dies führte dann eventuell zu den für eine Präzipitation und ein *crosslinking* nicht ausreichenden, plastidären Mengen an Epitop-markierter Polymerase.

4.2.2 Heterologe Expression der RpoTs aus Tabak und *Arabidopsis*

Für die heterologe Expression der RpoTs aus Tabak und *Arabidopsis* mit verschiedenen Affinitäts-*tags* wurden unterschiedliche Expressionssysteme verwendet. Zunächst wurde das pCold-System (TaKaRa) erprobt. Entsprechende Plasmide wurden von Alexandra-Viola Bohne im Rahmen ihrer Dissertation kloniert, sowie optimale Expressionsbedingungen und das Reinigungsverfahren mittels Affinitätschromatographie mit Ni²⁺-NTA-Agarose etabliert (Bohne, 2009; s. Kap. 2.2.10.7.2, 2.2.10.7.3 und 3.2.2.1). Dabei wurde bereits gezeigt, dass die entsprechenden His-markierten Phagentyp-RNA-Polymerasen transkriptionsaktiv, also funktionell und höchstwahrscheinlich korrekt gefaltet sind. Dies ist für eine Bindung potentieller Interaktionspartner essentiell. In dieser Arbeit wurden diejenigen Vektoren genutzt, welche die Expression von 6xHis-AtRpoTp, 6xHis-AtRpoTmp, 6xHis-NtRpoTp und 6xHis-NtRpoTmp ermöglichten. Die Expression von 6xHis-NtRpoTp gelang nicht bzw. die Menge an exprimierter Polymerase war trotz Optimierungsversuchen nicht ausreichend für eine effiziente Reinigung. Die Affinitätsreinigung der Polymerasen wurde stets durch SDS-PAGE überprüft und die Identität der His-markierten RpoT mittels *Western Blot* mit Anti-His Antikörper bestätigt. Ebenso wurde verfahren bei der Nutzung des in dieser Arbeit etablierten pJS-HisEx-Systems. Bei der Reinigung der His-getaggen RNA-Polymerasen traten stets auch einige zusätzliche Banden auf, die unspezifisch mitgereinigte, bakterielle Proteine repräsentierten. Um einen Einfluss dieser Proteine bzw. Peptide in späteren Versuchen zu kontrollieren, erfolgte parallel die Transformation von *E. coli*-Zellen mit dem leeren Expressionsvektor (pCold DNA I bzw. pJS-HisEx) und die anschließende Expression und Affinitätsreinigung. Diese Kontrollfraktion wurde in nachfolgenden *pull-down assays* mitgeführt. Des Weiteren wurde das pGEX-System zur Expression GST-fusionierter RpoTp

aus Tabak und *Arabidopsis* verwendet (s. Kap. 3.2.2.3). Auch für dieses System erfolgte eine Expression mit dem leeren pGEX-2TK-Vektor zur Reinigung von GST allein, welches als Kontrolle in allen Versuchen mitgeführt wurde. Der GST-tag ist im Vergleich zu einem Peptid-tag wie 6xHis sehr groß und könnte daher die Aktivität der fusionierten Polymerase sowie deren Interaktion mit anderen Proteinen beeinflussen. Daher wurde mit den gereinigten GST-RpoTs ein unspezifischer *in vitro* Transkriptionsassay durchgeführt und mit T7-RNA-Polymerase sowie gereinigtem GST verglichen. Da GST-RpoTp aus Tabak und *Arabidopsis* transkriptionsaktiv war, während GST allein keinerlei Aktivität zeigte, wurde gefolgert, dass der GST-tag die Funktionalität der Polymerasen nicht beeinträchtigte.

Für die *pulldown assays* wurden die jeweiligen Fusionsproteine und parallel die entsprechenden Kontrollfraktionen mit der Matrix und Stroma des Tabak- oder *Arabidopsis*-Wildtyps inkubiert. Durch *Western Blot* konnte nachgewiesen werden, dass die Präzipitation der RpoTs funktionierte. Im gefärbten SDS-Gel war für die 6xHis-Fusionsproteine stets nur eine sehr schwache oder keine Polymerase-Bande erkennbar. Effizienter gelang die Präzipitation der GST-Fusionsproteine. Je nach Variation der ionischen Stärke des Puffers und der Anzahl der Waschschrte wurden zusätzliche Banden beobachtet. Diese konnten anhand der Kontrollen jedoch als unspezifisch präzipitierte Proteine identifiziert werden. Sowohl die His-Peptid-Kontrollfraktion als auch GST ermöglichten dabei den Ausschluss von Banden, die zum Einen auf die Interaktion mit dem tag zurückgingen, und zum Anderen auf eine unspezifische Interaktion mit der Matrix. Trotz zahlreicher Modifikationen der Versuchsbedingungen, sowie unterschiedlich sensativer Färbemethoden wurden keine signifikant angereicherten Banden gefunden, die potentielle Interaktionspartner repräsentierten. Möglicherweise ist die Interaktion zwischen den RpoTs und ihren akzessorischen Proteinen zu schwach oder auch nur transient, so dass sie im Verlauf des Versuchs nicht stabil bleibt. Versuche mit unterschiedlichen Methoden des *crosslinkings* (Formaldehyd, DSP; nicht gezeigt) änderten das Resultat nicht. Zudem sind RpoTp- und RpoTmp-Transkripte sowie die aktiven Enzyme in Chloroplasten nur in geringen Mengen vorhanden (Emanuel *et al.*, 2006; Azevedo *et al.*, 2006). Daher sind vermutlich auch ihre potentiellen Interaktionspartner nicht sehr abundant im Stroma und somit schwer zu identifizieren. Problematisch ist dabei auch, dass insbesondere die 6xHis-fusionierten RpoTs nicht effizient präzipitiert werden konnten. Somit sind auch für interagierende Transkriptionsfaktoren nur sehr schwache Banden zu erwarten. Des Weiteren ist es möglich, dass eine stabile Interaktion der RpoTs mit potentiellen Transkriptionsfaktoren von Cofaktoren wie beispielsweise NTPs abhängt. Die mitochondriale RNA-Polymerase Rpo41

aus Hefe interagiert mit dem Transkriptionsfaktor Mtf1 ohne derartige Cofaktoren um den offenen Promotorkomplex zu bilden (Deshpande und Patel, 2012), bevor die initiiierenden NTPs rekrutiert werden. Allerdings gibt es Hinweise, dass Mtf1 an der Bindung des initiiierenden NTP bzw. ATP beteiligt ist (Tang *et al.*, 2009; Paratkar *et al.*, 2011). Der Zusatz von MgATP zum Versuchsansatz eines *pulldown assays* (nicht gezeigt) erbrachte keine Veränderung des Resultats. Aus Zeitgründen wurden schließlich nicht dieser Ansatz, sondern andere Ansätze weiter verfolgt.

4.2.3 *In vivo* Expression Epitop-markierter RpoTs in *Arabidopsis* und Charakterisierung der transgenen Pflanzen

Die RNA-Polymerasen RpoTp, RpoTmp und RpoTm aus *Arabidopsis* wurden *in vivo* mit den N-terminal fusionierten Epitopen 3xFLAG, 3xHA bzw. FLAG-HA exprimiert (s. Kap. 3.2.3). Dabei sollte die Transkription vom 35S-Promotor des Blumenkohl-Mosaikvirus zu einer konstitutiven Überexpression führen. Die potentiellen Transformanten der transgenen Linien FLAG-HA-Tp/mp/m, 3xFLAG-Tp/mp/m und 3xHA-Tp/mp/m wurden zunächst mittels PCR mit Polymerase- und *tag*-spezifischen Oligonukleotiden durchmustert, die PCR-Fragmente wurden sequenziert, und positive Linien wurden mittels *Western Blot* auf die Expression der jeweiligen Epitop-markierten Polymerase hin untersucht (s. Kap. 3.2.3.2). Es resultierte die Auswahl der transgenen Linien 3xFLAG-Tp TL3 und TL6, 3xFLAG-Tmp TL7 und 3xFLAG-Tm TL3, TL6 und TL7 für weitere Versuche, wobei vor allem mit 3xFLAG-Tp TL3 und 3xFLAG-Tmp TL7 gearbeitet wurde. Trotz der theoretisch konstitutiven Expression wurde die stärkste Expression für 3xFLAG-Tp TL3 und 3xFLAG-Tmp TL7 7 d nach Aussaat beobachtet. Auch nach 14 d war die Expression noch sehr stark. Des Weiteren wurde deutlich, dass die Expression von 3xFLAG-RpoTmp bei gleichen Auftragsmengen von Stroma stets um 30-50 % der 3xFLAG-RpoTp-Expression betrug. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass die Expression im Stroma nachgewiesen wurde, denn im späteren Verlauf der Arbeit zeigte sich, dass ein signifikanter Anteil von RpoTmp wie auch durch Azevedo *et al.* (2006) beschrieben membrangebunden war (s. Kap. 4.2.3.2). Für 3xFLAG-RpoTmp und zu frühen Zeitpunkten der Entwicklung auch für 3xFLAG-RpoTp wurden im *Western Blot* zwei Banden beobachtet. Aus dem Vergleich der Signale, die für 3xFLAG-Tp mit Anti-FLAG Antikörper und für 3xHA-Tp mit Anti-HA Antikörper erhalten wurden, wobei die jeweils exprimierten Polymerasen laut Vorhersage durch ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) annähernd dasselbe Molekulargewicht aufwiesen, wurde geschlussfolgert, dass die obere Bande die intakte, Epitop-markierte Polymerase repräsentierte. Auch der Umstand, dass in 3xFLAG-Tp TL3 die untere Bande ab 14 d nach Aussaat deutlich reduziert war, sprach für diese Interpretation. Die

untere Bande könnte auf einen teilweisen Abbau des *tags* oder der wenigen AS vor dem Epitop der 3xFLAG-RpoTs zurückgeführt werden.

Da für eine spätere Co-Präzipitation von interagierenden Proteinen eine korrekte Faltung der exprimierten RpoTs Voraussetzung ist, wurde die Funktionalität von 3xFLAG-RpoTp und -Tmp mittels *primer extension* überprüft (s. Kap. 3.2.3.3). Außerdem wurden die Effekte der RpoTp- bzw. RpoTmp-Überexpression auf Transkriptebeene durch *Northern Blot* mit spezifischen Sonden für Gene, die durch NEP oder PEP oder beide Enzyme transkribiert werden, analysiert (s. Kap. 3.2.3.4). Für die NEP-Promotoren *PaccD*-172, *PatpB*-318 und *PclpP*-58 wurde in den *primer extension* Analysen in 3xFLAG-Tp TL3 eine verstärkte Promotornutzung beobachtet. Daraus wurde gefolgert, dass 3xFLAG-RpoTp nicht nur überexprimiert wurde, sondern auch funktionell war, sodass die Linie für die Suche nach Interaktionspartnern geeignet war. Für die übrigen Promotoren von *atpB* wurden keine Unterschiede in den Signalintensitäten beobachtet (nicht gezeigt). Dadurch wurde deutlich, dass eine verstärkte Nutzung des NEP-Promotors die Transkription des Gens durch PEP nicht behindert. Die verstärkte Transkription einiger NEP-anhängiger Gene war auch insofern bemerkenswert, dass offensichtlich die Überexpression der Polymerase ausreichte, um diesen Effekt zu bewirken. Das bedeutet, dass vermutlich benötigte Transkriptionsfaktoren für die NEP-Aktivität nicht limitierend waren - eine wichtige Voraussetzung für die beabsichtigte Suche nach diesen Faktoren. Weiterhin wurden für die Gene *atpB*, *accD*, *clpP*, *rpoB* und *ycfI* in 3xFLAG-Tp TL3 gegenüber dem Wildtyp erhöhte Transkriptmengen beobachtet. Für *accD* und *rpoB*, die ausschließlich durch NEP transkribiert werden, entsprach dies den Erwartungen und korrelierte mit den *primer extension* Analysen. Das Gen *ycfI* wird durch NEP und PEP transkribiert, ebenso wie *clpP* und *atpB* (Swiatecka-Hagenbruch *et al.*, 2007). Swiatecka-Hagenbruch *et al.* (2008) beobachteten keine signifikante Verstärkung der Nutzung der NEP-Promotoren *PatpB*-318 und *PycfI*-39 in RpoTp-überexprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen (Tp1x). Die erhöhten Transkriptmengen für *ycfI* und *atpB*, sowie die verstärkte Nutzung von *PatpB*-318 in dieser Arbeit deuteten jedoch auf eine stärkere Transkription dieser Gene in 7-14 d alten Keimlingen hin. Interessant war insbesondere, dass entsprechend den *primer extension* Analysen und erhöhten Transkriptmengen offenbar RpoTp am *non-consensus* NEP-Promotor von *clpP* die Transkription initiierte. Liere *et al.* (2004) beobachteten in RpoTp-überexprimierenden Tabakpflanzen lediglich für Typ-I NEP-Promotoren eine verstärkte Promotornutzung. Auch frühere Versuche mit RpoTp- und RpoTmp-überexprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen zeigten keine verstärkte Nutzung des *clpP*-Promotors für RpoTp-Mutanten und eine leicht verstärkte Nutzung für RpoTmp-Mutanten (Swiatecka, 2003;

Swiatecka-Hagenbruch *et al.*, 2008). Daten von Courtois *et al.* (2007) allerdings korrelieren mit den hier gezeigten Analysen, da sie auf eine Erkennung des *clpP*-Promotors durch RpoTp hindeuteten. Für 3xFLAG-Tmp TL7 wurden keine verstärkte Nutzung von NEP-Promotoren und auch keine Änderungen der Transkriptlevel gegenüber dem Wildtyp gefunden. Möglicherweise war dies auf die geringe Abundanz der Epitop-markierten RpoTmp zurückzuführen, die bereits in den *Western Blot* Analysen gezeigt wurde. Des Weiteren scheint RpoTp diejenige RNA-Polymerase darzustellen, die hauptsächlich für die Transkriptionsinitiation an NEP-Promotoren verantwortlich ist. Allerdings wurde gezeigt, dass RpoTmp zumindest das *rrn*-Operon in frühen Phasen der Chloroplastenreifung transkribiert (Courtois *et al.*, 2007). Dennoch konnte auch in *primer extension* Analysen der *rrn16*-Promotorregion keine verstärkte Nutzung des Pc-Promotors *Prrn16-39* nachgewiesen werden. Dies muss jedoch nicht bedeuten, dass 3xFLAG-RpoTmp nicht funktionell war. Zwar war die Expression der Polymerase in den 7-14 d alten Pflanzen am stärksten, jedoch war vermutlich die Transkriptionsaktivität zu gering, da RpoTmp vor allem zu Beginn der Keimung transkribiert (Baba *et al.*, 2004; Courtois *et al.*, 2007) und in Kotyledonen und Blättern bisher keine oder nur wenig Pc-initiierte *rrn16*-Transkripte nachgewiesen werden konnten (Sriraman *et al.*, 1998a; Bisanz *et al.*, 2003; Zoschke *et al.*, 2007).

Die auf RNA-Ebene gezeigten Effekte wurden auf Proteinebene nicht wiedergespiegelt. Sowohl für das D1-Protein, welches durch das PEP-transkribierte Gen *psbA* kodiert wird, als auch für AtpB, für das erhöhte Transkriptmengen in 3xFLAG-Tp TL3 gezeigt wurden, wurden keine veränderten Proteinlevel beobachtet. Dies ist sicherlich auf posttranskriptionale Mechanismen und die Regulation der Translation und posttranslationaler Prozesse zurückzuführen. Interessant ist dabei auch, dass trotz der Transkription von *rpoB* ausschließlich durch NEP eine Überexpression von RpoTp nicht zu einer erhöhten Menge an PEP führte, wie durch die wildtypischen Mengen von RpoB und auch RpoA verdeutlicht wurde. Cahoon *et al.* (2004) zeigten bereits in Mais, dass im Laufe der Chloroplastenentwicklung die Akkumulation NEP-kontrollierter Transkripte annähernd gleich blieb, da zwar die NEP-Transkriptionsaktivität zunahm, jedoch die RNA-Stabilität abnahm. Entsprechende Regulationsmechanismen spielten vermutlich auch im RpoTp-Überexpressor eine Rolle, sodass Proteinlevel letztlich unverändert blieben.

4.2.3.1 3xFLAG-RpoTp ist kältesensitiv

Die Untersuchung des makroskopischen Phänotyps der transgenen Pflanzen zeigte bei Anzucht auf Erde oder MS-Medium keinerlei Unterschiede zum Wildtyp. Unter

Selektionsdruck entwickelten 3xFLAG-Tp TL3 und TL6 sowie 3xFLAG-Tmp TL7 grüne Kotyledonen. Zu einem geringen Anteil waren diese Keimlinge etwas kleiner als der parallel auf MS-Medium angezogene Wildtyp. Zudem waren bei 3xFLAG-Tmp die ersten beiden Rosettenblätter gelblich und fransig. In Anbetracht des charakteristischen Ausbleichens von Blattgewebe in Pflanzen mit Translationsdefekten (Siemenroth *et al.*, 1981; Han *et al.* 1993; Hess *et al.*, 1993; Allison *et al.*, 1996; Serino und Maliga, 1998; De Santis-MacIossek *et al.*, 1999; Krause *et al.*, 2000), könnte dies die Folge einer mangelhaften Translation sein. Nach 7-10 d waren für 3xFLAG-Tp keine Entwicklungsunterschiede mehr zum Wildtyp erkennbar. Bei 3xFLAG-Tmp ergrüntten die gelblichen Blätter mit 1-2 d Verzögerung und die Pflanzen zeigten nach spätestens 14 d dasselbe Erscheinungsbild wie der Wildtyp. In Versuchen von Swiatecka-Hagenbruch *et al.* (2008) zeigten RpoTp-Überexpressoren mit einer Kopie des Transgens kaum Unterschiede zum Wildtyp. Demgegenüber spalteten Mutanten mit 5 Kopien in gelbliche und grüne Keimlinge auf, und wiesen auch im weiteren Verlauf eine deutliche Entwicklungsverzögerung mit kleineren Rosetten auf, was auf einen schnelleren Umsatz der *RpoTp*-Transkripte und/oder teilweisem *gene silencing* durch die hohe Kopienzahl zurückgeführt wurde. Da die in dieser Arbeit produzierten RpoTp-Überexpressoren nur geringfügige Unterschiede zum Wildtyp zeigten, kann spekuliert werden, dass in diesen nur eine bzw. wenige Kopien des Transgens inseriert waren. Interessanterweise zeigten die 3xFLAG-RpoTmp-Überexpressoren deutlichere Entwicklungseffekte gegenüber dem Wildtyp, während RpoTmp-Überexpressoren mit einer, 5 oder 7 Genkopien keine Unterschiede zum Wildtyp aufwiesen (Swiatecka, 2003). Somit sind die Entwicklungsdefizite in dieser Arbeit vermutlich nicht durch die Kopienzahl bedingt, sondern hängen möglicherweise mit dem Insertionsort des Transgens zusammen oder sind darauf zurückzuführen, dass sich die Überexpression RpoTmp-abhängiger Chloroplastengene ungünstig auswirkt. Dennoch hatte die Insertion, wie *Northern Blots*, *primer extension* Analysen und *Western Blots* veranschaulichten, keine drastischen Auswirkungen auf die Genexpression in 3xFLAG-Tmp TL7. Unter Kältestress, bei Anzucht 17 d alter Pflanzen bei 8 °C auf Erde, wiederum wurde kein Effekt für 3xFLAG-Tmp, jedoch für 3xFLAG-Tp beobachtet. Insbesondere die jeweils jüngsten Blätter blichen in den transgenen Linien 3xFLAG-Tp TL3 und TL6 aus. Scheinbar kam es zu einem Abbau der Thylakoidmembran und der Photosynthesekomplexe. Tatsächlich konnte im *Northern Blot* eine Reduktion der PEP-Transkripte *psbA* und auch *rbcL* in den gebleichten Blättern, also vermutlich eine veränderte PEP-Aktivität nachgewiesen werden. Für eine Wiederholung des Versuchs und den Nachweis eines entsprechenden Effekts auf Proteinebene blieb im Zuge dieser Arbeit

keine Zeit. Da die Transkriptlevel für *accD* und *clpP*, die ausschließlich bzw. teilweise durch NEP transkribiert werden, im Vergleich zum Wildtyp unverändert waren, obwohl unter Standardbedingungen eine Erhöhung der Transkripte beobachtet worden war, hatte die Kälte offenbar auch Einfluss auf die NEP-Aktivität. Wie kann nun die Kältesensitivität der RpoTp-Überexpressoren erklärt werden? Ein Ausbleichen bei Kältestress konnte in der Vergangenheit bereits in unterschiedlichen Mutanten beobachtet und mit Defekten der Reifung plastidärer Ribosomen und folglich einer Reduktion der plastidären Translation in Verbindung gebracht werden. Beispielsweise war in der Maismutante *M11*, welche ab 17 °C und darunter kein Chlorophyll akkumuliert, die Menge plastidärer Ribosomen reduziert (Millerd *et al.*, 1969). Eine Ribosomendefizienz bei geringen Temperaturen wurde auch für die *v16/v16* Maismutante beobachtet (Hopkins und Elfman, 1984). Der Verlust einer 16S rRNA Dimethylase (DIM1-Homolog) in *Arabidopsis* (*pfc1* Mutante) hatte keinen phänotypischen Effekt unter Normalbedingungen, führte bei 5 °C jedoch zur Chlorose (Tokuhisa *et al.*, 1998). Ein weiteres Beispiel für das kältesensitive Ausbleichen in *Arabidopsis* ist die Null-Mutante eines plastidären Elongationsfaktors der Translation (*SVR3*; Liu *et al.*, 2010). Es kann spekuliert werden, dass die durch Überexpression erhöhten Mengen von RpoTp bei Kältestress, aufgrund der verringerten Dynamik der Molekülbewegung bei Kälte, länger auf den Transkripten verblieben und somit das Binden und auch Fortschreiten der Ribosomen behinderten. Da NEP auch Gene für ribosomale Komponenten transkribiert, könnte es darüber hinaus zu einem Mangel an Ribosomen kommen. Damit würde auch die Translation PEP-transkribierter Gene reduziert, sodass es zu einer Reduktion von Photosystem-Komponenten und zum Ausbleichen kommen kann, wie es für zahlreiche Pflanzen bzw. Mutanten mit Translationsdefiziten bekannt ist (Siemenroth *et al.*, 1981; Han *et al.* 1993; Hess *et al.*, 1993; Allison *et al.*, 1996; Serino und Maliga, 1998; De Santis-MacIossek *et al.*, 1999; Krause *et al.*, 2000). Interessant wäre zu überprüfen, ob auch andere RpoT-Überexpressoren (Swiatecka-Hagenbruch *et al.*, 2008) unter Kältestress einen entsprechenden Phänotyp und die Effekte auf RNA-Ebene zeigen.

4.2.3.2 RpoTmp aus *Arabidopsis* ist in den Chloroplasten und Mitochondrien lokalisiert sowie in den Plastiden wie auch RpoTp teilweise membrangebunden

RpoTp ist in den Chloroplasten lokalisiert, was beispielsweise durch Lokalisationsstudien mit GFP-Fusionen für *Arabidopsis* nachgewiesen wurde (Hedtke *et al.*, 1999). Für RpoTmp wurde ein Transport in Chloroplasten und Mitochondrien postuliert (Hedtke *et al.*, 2000). Wurde das putative Transitpeptid der *Arabidopsis*-RpoTmp (Hedtke *et al.*, 2000) oder der beiden *Physcomitrella*-RpoTmps (Richter *et al.*, 2002) an GFP fusioniert, erfolgte ein

Transport des GFP sowohl in die Plastiden als auch die Mitochondrien. Kabeya und Sato (2005) postulierten, dass es sich bei diesem Effekt um ein Artefakt handelte und diese Polymerasen tatsächlich ausschließlich mitochondrial lokalisiert sind. Das homologe Protein in Spinat wurde wiederum in Chloroplasten nicht aber in Mitochondrien gefunden (Azevedo *et al.*, 2006). Verschiedene Studien wiesen aber eine Funktion von RpoTmp in der Transkription der Plastiden (Baba *et al.*, 2004; Hricova *et al.*, 2006; Courtois *et al.*, 2007) und der Mitochondrien (Kühn *et al.*, 2009) nach. Des Weiteren deuteten *Western Blot* Analysen von Azevedo *et al.* (2006) in Spinat darauf hin, dass RpoTp und RpoTmp in reifen Chloroplasten vollständig an die Thylakoid- und Hüllmembran gebunden sind. Die in dieser Arbeit *in vivo* exprimierten Phagentyp-RNA-Polymerasen konnten anhand des FLAG-Epitops mittels *Western Blot* sowohl im Stroma als auch in der Membranfraktion nachgewiesen werden (s. Kap. 3.2.3.7). Dabei war in 21 d Tage alten Pflanzen der Großteil von RpoTp löslich, hingegen RpoTmp größtenteils membranassoziiert (s. Kap. 3.2.3.7, Abb. 45A). Um das Verhältnis von löslicher und gebundener Polymerase innerhalb eines Chloroplasten besser zu beleuchten, wurden ausgehend von einer bestimmten Menge isolierter Chloroplasten gleiche Volumina des Stromas und der Membranpräparation untersucht (s. Kap. 3.2.3.7, Abb. 45B). Da eine ausschließlich auf eine Membranverunreinigung des Stromas zurückgehende RpoT-Bande schwächer sein müsste als die entsprechende Bande in der Membranfraktion, die Signale jedoch gleich stark waren, wurde deutlich, dass sowohl RpoTp als auch RpoTmp in den reifen Chloroplasten 14 d alter Pflanzen zu einem gewissen Anteil in löslicher Form vorliegen. Die für Spinat gezeigten Daten hinsichtlich einer vollständigen Membranbindung der Polymerasen (Azevedo *et al.*, 2006) konnten also in *Arabidopsis* nicht bestätigt werden. Zudem wurden auch mit den im Kapitel 3.2.1 beschriebenen HFS-RpoTp Tabakmutanten Lokalisationstudien durchgeführt (nicht gezeigt). Dabei konnte die exprimierte Polymerase ausschließlich im Stroma, nicht aber in der Membranfraktion detektiert werden, wodurch auch in Tabak gezeigt wurde, dass RpoTp nicht vollständig membranassoziiert ist. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass 3xFLAG-RpoTmp auch in die Mitochondrien transportiert wird. Die Mitochondrienpräparation enthielt zwar geringe Mengen an verunreinigenden Stromaproteinen, jedoch deutlich weniger als das untersuchte Aliquot des Stromas. Dennoch war das Polymerasesignal in den Mitochondrien kräftiger, konnte also nicht ausschließlich auf die Verunreinigung zurückgehen. Im Gegensatz zu den bisher für Spinat erhältlichen Daten (Azevedo *et al.*, 2006), wurde somit für *Arabidopsis* eine duale Lokalisation von RpoTmp nachgewiesen. Damit ist auch das Postulat einer exklusiven Lokalisation der *Arabidopsis* RpoTmp in den Mitochondrien widerlegt (Kabeya and Sato 2005).

Die Membranassoziation von RpoTmp im Zuge der Chloroplastenreifung geht mit funktionellen Veränderungen einher (Azevedo *et al.*, 2008). Demnach liegt RpoTmp im nicht-photosynthetischen Gewebe (Protoplasten/ Amyloplasten) löslich vor. Während der lichtinduzierten Reifung der Plastiden und der Etablierung der Thylakoide wird auch die Expression eines speziellen NIPs (*NEP interacting protein*) aktiviert, welches laut Modell durch Interaktion RpoTmp an der Thylakoidmembran fixieren und dadurch die Transkriptionsaktivität beeinflussen soll. Folglich müsste im Verlauf der Entwicklung der Pflanze die Menge an membrangebundener RpoTmp und möglicherweise auch RpoTp zunehmen. In 3xFLAG-Tp TL3 wurden in 14 d alten Pflanzen annähernd gleich starke Banden in Stroma und Membran detektiert (s. Kap. 3.2.3.8, Abb. 46). Da die Membranpräparation geringfügige Verunreinigungen mit Stromaproteinen enthielt, war demnach der Anteil löslicher Phagentyp-Polymerase etwas größer. In 28 d alten Pflanzen jedoch überwog der Anteil membrangebundener RpoTp deutlich. Auch in 3xFLAG-Tmp TL7 nahm die Menge an membrangebundener Polymerase im Lauf der Entwicklung zu. Das Prinzip der zunehmenden Membranassoziation im Zuge der Chloroplastendifferenzierung konnte also bestätigt werden. Ob aber eine Membranassoziation ein Indiz für die Inaktivierung von RpoTmp oder auch RpoTp ist, ist fraglich, da der plastidäre Transkriptionsapparat sowie die Chloroplasten-DNA ähnlich wie in Bakterien vermutlich ohnehin mit der Membran assoziiert sind (Sato, 2001; Sato *et al.*, 2003; Karcher *et al.*, 2009; Schweer *et al.*, 2010). Zudem wurde durch Cahoon *et al.* (2004) in Mais gezeigt, dass die Transkriptionsaktivität von NEP im Zuge der Plastidenreifung sogar zunahm, und lediglich die Abundanz von NEP sowie die Stabilität der NEP-Transkripte abnahm.

4.2.3.3 Immunopräzipitation von 3xFLAG-RpoTp und 3xFLAG-RpoTmp

Sowohl mit Anti-FLAG Antikörper plus rec-Protein-A-Sepharose, als auch mit Anti-FLAG® M2 Affinity Gel, einer Matrix an der der Antikörper immobilisiert ist, gelang die Präzipitation von 3xFLAG-RpoTp aus Stroma und 3xFLAG-RpoTmp aus Chloroplasten- und Mitochondrienlysaten. Ein *crosslinking* Versuch mit Formaldehyd (s. Kap. 3.2.3.9, Abb. 48) veranschaulichte, dass im Stroma offenbar tatsächlich Proteine vorliegen, die mit 3xFLAG-RpoTp interagieren. Dieses Resultat konnte reproduziert werden. Daher wurden zahlreiche IP-Versuche durchgeführt um derartige Proteine zu identifizieren, wobei die Versuchsbedingungen variiert wurden um eine möglichst effiziente Präzipitation der Polymerasen zu gewährleisten (s. Kap. 3.2.3.9). Um co-präzipitierte Proteine, die entweder

unspezifisch mit dem Antikörper oder der Matrix interagierten, zu erkennen, wurde als Kontrolle stets eine IP mit Wildtyp-Stroma durchgeführt. Nach Auftrennung der IP-Eluate mittels SDS-PAGE wurden einige zusätzliche Banden ausgeschnitten und für die Identifizierung mittels *peptide mass fingerprinting* eingesetzt. Als vielversprechendste Kandidaten für eine potentielle Interaktion mit RpoTp wurden dabei Ycf1 und Ycf2 gefunden.

4.2.4 Ycf1 und Ycf2 als Kandidaten für eine Interaktion mit NEP

Aufgrund der geringen Anzahl an Peptidsequenzen, die für einen Abgleich mit verschiedenen Datenbanken wie MASCOT Peptide Mass Fingerprint (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF) genutzt werden konnten, war die jeweilige Wahrscheinlichkeiten, dass es sich bei dem gefundenen Protein tatsächlich um dieses handelt, relativ gering. Auffällig war jedoch, dass es sich bei den meisten Treffern mit den höchsten *scores* jeweils um membrandurchspannende ATPasen handelte. Aufgrund ihrer plastidären Lokalisation und der meisten Übereinstimmungen mit den analysierten Peptiden wurden Ycf1 und Ycf2 aus der Liste an möglichen Kandidaten als die sinnvollsten erachtet.

Die Genprodukte von *ycf1* und *ycf2* sind für höhere Pflanzen essentiell (Drescher *et al.*, 2000). Für beide Proteine ist die zelluläre Funktion jedoch bisher unbekannt. Ycf1 durchspannt mit sieben Transmembrandomänen die plastidäre Hüllmembran und besitzt konservierte Nukleotidbindestellen, die eine Funktion als ATPase möglich machen (Boudreau *et al.*, 1997). Das Gen *YCF1* aus *S. cerevisiae* kodiert für ein ABC (*ATP-binding cassette*)-Protein und fungiert als vakuoläre Glutathion S-Konjugat Pumpe, die für die Cadmium-Ionen Homöostase der Zellen benötigt wird (Li *et al.*, 1996; Mielniczki-Pereira *et al.*, 2008). In *Arabidopsis* und auch *C. reinhardtii* übernehmen aber andere Proteine als Ycf1 derartige Funktionen (Wang und Wu, 2006; Tehseen *et al.*, 2010). Somit ist unklar, welcher Art eine ATPase-abhängige Funktion von Ycf1 sein könnte. In welchem Zusammenhang könnte also eine Interaktion zwischen RpoTp und Ycf1 stehen? Könnte Ycf1 als transkriptionsaktivierender Faktor agieren bzw. Teil einer Signaltransduktionskaskade sein? Zwar ist Ycf1 membrangebunden, jedoch wurde bereits gezeigt, dass auch RpoTp teilweise membranassoziiert ist und zudem für den plastidären Transkriptionsapparat eine Membranassoziation vermutet wird (Sato, 2001; Sato *et al.*, 2003; Karcher *et al.*, 2009; Schweer *et al.*, 2010). Möglicherweise spielt hierbei die C-terminale, Lysin-reiche Region von Ycf1 eine Rolle. Der Transkriptionsfaktor YY1 aus der Ratte besitzt beispielsweise eine Gly-/Lys-reiche Region (Nishiyama *et al.*, 2003). Auch für den generellen Sigmafaktor in *Helicobacter pylori* wurde eine Lys-reiche Region

gefunden, die unter Nährstoffmangel als Bindestelle für den *second messenger* Polyphosphat fungiert (Yang *et al.*, 2010). Kreft und Nassal (2003) identifizierten ein Protein, welches über eine Lys-reiche Region Virus-Transkripte bindet. Daher ist es durchaus denkbar, dass auch Ycf1 eine Rolle innerhalb der Regulation der Transkription spielt. Jedoch ist dies eher nicht die prominente Rolle des Proteins, da die Mutation des Gens letal ist (Drescher *et al.*, 2000), wohingegen ein Ausschalten von RpoTp oder RpoTmp nicht letal ist (Baba *et al.*, 2004; Hricova *et al.*, 2006).

Ycf2 ist ein Stroma-Protein, welches C-terminal Nukleotidbindestellen aufweist, die typisch sind für die ATPase-Module der *FtsH* und *CDC48* Genfamilien von Grünalgen und Eubakterien (Wolfe, 1994). Es sind bereits plastidäre FtsH Metalloproteasen in Pflanzen bekannt, die in der Chloroplastenbiogenese und Protein-Qualitätskontrolle fungieren (Wagner *et al.*, 2012). In *Arabidopsis* sind beispielsweise FtsH1, 2, 5 und 8 als hetero-hexamerer Komplex in der Thylakoidmembran lokalisiert (Moldavski *et al.*, 2012; Wagner *et al.*, 2012) und wirken beim Abbau von photogeschädigtem D1-Protein mit (Kato und Sakamoto, 2009). Auch *CDC48* wurde in *Arabidopsis* bereits identifiziert und für das Genprodukt gezeigt, dass es die Hefemutante *cdc48* komplementierte (Feiler *et al.*, 1995). CDC48 ist wichtig für die Cytokinese und Zelldifferenzierung in Pflanzen. Allerdings ist CDC48A aus *Arabidopsis* im Nukleus und dem Cytoplasma lokalisiert (Park *et al.*, 2008), also dessen Funktion eher nicht mit einer möglichen Funktion von Ycf2 vergleichbar. Auch wenn FtsH-Proteine und CDC48 in Pflanzen bereits charakterisiert sind, könnte Ycf2 aufgrund der Ähnlichkeiten zu diesen Proteinen an Prozessen wie Plastidenteilung, Proteinabbau und –transport beteiligt sein. Auf der anderen Seite sind Transkriptionsfaktoren mit ATPase-Aktivität bekannt (Broyles und Moss, 1988; Conaway und Conaway, 1989; Lee *et al.*, 2002). Auch wenn bisher keine DNA-Bindedomäne oder –aktivität von Ycf2 beschrieben wurde, ist die Möglichkeit, dass Ycf2 in der Transkription durch RpoTp involviert ist, ein interessanter Gedanke und würde auch erklären, warum gerade Ycf2 in den Co-IPs mit RpoTp detektiert wurde. Allerdings zeigten phylogenetische Vergleiche, dass mit Ausnahme der ATP-Bindemodule die kodierende Sequenz für Ycf2 (*ORF2280* in Tabak) schwach konserviert ist und zudem sehr tolerant gegenüber Insertionen und Deletionen (Wolfe und Sharp 1988; Zhou *et al.*, 1988; Downie *et al.*, 1994). Darüber hinaus wurden zwar homologe Sequenzen in verschiedenen Spezies gefunden (Spinat ORF2131, Zhou *et al.*, 1988; *Epifagus* ORF2216, Wolfe *et al.*, 1992; *Marchantia* ORF2136, Ohyama *et al.* 1986), allerdings haben die Plastome monokotyler Pflanzen wie Mais und Reis das *ycf2* Gen verloren (Hiratsuka *et al.*, 1989; Downie *et al.*, 1994), was Ycf2 als generellen Faktor in der Transkription eher ausschließt. Ein

entsprechender Schluss muss letztlich auch für *Ycf1* gezogen werden, da beispielsweise *Cuscuta* Spezies des Subgenus *Grammica*, die entsprechend ihrer parasitischen Lebensweise keine eigene Photosynthese betreiben und daraus folgend zahlreiche, plastidäre Gene wie die *rpo* Gene verloren haben (Krause *et al.*, 2003; Stefanović und Olmstead, 2005), somit also auf NEP-abhängige Transkription angewiesen sind, auch *ycf1* verloren haben (Braukmann *et al.*, 2013).

4.2.5 Co-Präzipitation von RNAs

Die Immunopräzipitation von 3xFLAG-RpoTp und -RpoTmp wurde genutzt, um mittels RIP-Chip zu untersuchen, welche RNAs zu einem bestimmten Zeitpunkt der Entwicklung mit den Polymerasen assoziiert sind. Dies sollte verdeutlichen, welche Gene durch die jeweilige RpoT transkribiert werden und ob eventuell RNAs gebunden werden, für die bisher eine Transkription durch NEP nicht bekannt ist. Vorab wurden co-präzipitierte RNAs mittels *Dot Blot* analysiert (s. Kap. 3.2.5, Abb. 51). Dabei wurde bereits deutlich, dass entsprechend der geringen Menge an präzipitierter 3xFLAG-RpoTp auch die Menge mit gefällter RNAs gering war. Lediglich für *clpP* konnte eine leichte Anreicherung beobachtet werden. Dies zeigt erneut, dass der NEP-Promotor *PclpP-58* von RpoTp genutzt wird, wie schon durch die *Northern Blots* und *primer extension* Analysen verdeutlicht wurde (s. Kap. 4.2.3).

Im anschließenden RIP-Chip wurden *ycf2*-Transkripte co-präzipitiert. Für dieses Gen ist bereits bekannt, dass es durch NEP transkribiert wird (Hajdukiewicz *et al.*, 1997; Liere und Börner, 2007), obwohl Demarsy *et al.* (2012) Hinweise erhielten, dass *ycf2* in *Arabidopsis* auch durch PEP kontrolliert wird. Des Weiteren hybridisierte die gefällte RNA mit *rbcL*. Dabei erfolgte die Bindung nicht an dasjenige Fragment auf dem *microarray*, welches den Überlappungsbereich von *atpB* und *rbcL* repräsentierte, sondern an das *rbcL*-Fragment, welches die Plastompositionen 55974-56459 umspannt. Somit stellte die Detektion von *rbcL*-Transkripten kein Artefakt der eigentlichen Co-Präzipitation von *atpB*-Transkripten dar. Ebenso wenig kann es sich um Artefakt der Co-Präzipitation unprozessierter Transkripte des stromabwärts gelegenen, durch NEP transkribierten *accD* handeln, da die bisher kartierten *accD*-NEP-Promotoren deutlich stromabwärts des im RIP-Chip detektierten Fragments liegen. Nach bisherigem Kenntnisstand wird *rbcL* in *Arabidopsis* durch PEP transkribiert. Courtois *et al.* (2007) veranschaulichten dies durch *primer extension* Analysen mit *RpoTp*- und *RpoTmp*-Insertionslinien. Auch die Transkriptom-Profile von Demarsy *et al.* (2012) nach Behandlung mit Tagetin untermauerten dies. Des Weiteren wird auch *rbcL* in Tabak von PEP transkribiert (Orozco *et al.*, 1990; Shiina *et al.*, 1998). Allerdings gibt es auch Hinweise auf

eine Transkription von *rbcL* durch NEP. Allison *et al.* (1996) detektierten in *primer extension* Analysen mit $\Delta rpoB$ Tabakmutanten prozessierte Enden von *rbcL*-Transkripten, die vermutlich auf bis dahin unbekannte, stromaufwärts liegende Promotoren zurückgingen. Dies könnte ein Indiz für eine NEP-abhängige Transkription von *rbcL* sein. Weiterhin fanden Zhelyazkova *et al.* (2012b) Hinweise auf einen NEP-Promotor stromaufwärts des *rbcL*-Gens in Gerste. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch in *Arabidopsis* unter bestimmten Bedingungen oder zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung eine Transkription von *rbcL* durch NEP erfolgt. Weiterhin hybridisierte die co-präzipitierte RNA mit Exon 1 und Exon 2 von *ndhB* auf dem Chip. Das Gen *ndhB* wird gemeinsam mit *rps7* als polycistronischer Vorläufer transkribiert (Hashimoto *et al.*, 2003). Auf dem Gegenstrang liegt das NEP-transkribierte Gen *rps12*, dessen 3'-Intronbereich teilweise die *rps7*-Sequenz überspannt, jedoch nicht die Exonbereiche von *ndhB*. Somit handelte es sich bei dem Ergebnis nicht um ein Artefakt, welches aus der Präzipitation des NEP-Transkripts *rps12* resultierte. Es wurde bisher vermutet, dass die Transkription von *ndhB* in *Arabidopsis* durch PEP erfolgt, und Daten von Demarsy *et al.* (2012) unterstützen diese Vermutung. Hajdukiewicz *et al.* (1997) fanden in $\Delta rpoB$ Tabakmutanten wie auch im Wildtyp hohe Transkriptlevel von *ndhB* und spekulierten daher, dass das Gen höchstwahrscheinlich von PEP und NEP transkribiert wird. Außerdem zeigten Zhelyazkova *et al.* (2012b), dass in Gerste die Transkriptionsstartstelle *TndhB*-275 in weißen aber nicht in grünen Plastiden angereichert war, was wiederum auf einen im grünen Gewebe genutzten NEP-Promotor hindeuten könnte. Daher ist es denkbar, dass auch in *Arabidopsis* NEP an der Transkription von *ndhB* beteiligt ist. Die Hybridisierung mit dem *psbE-petL*-Abschnitt ist überraschend, da das Photosynthesegen *psbE* durch PEP transkribiert wird (Hajdukiewicz *et al.*, 1997; Baba *et al.*, 2004). Zhelyazkova *et al.* (2012b) fanden für einige TSS wie *TpsbA*-80 und *TpsbN*-43 eine Anreicherung in grünen und weißen Gerste-Plastiden und die Analyse der Promotormotive deutete darauf hin, dass es sich möglicherweise um überlappende Motive handelt, die von PEP und NEP erkannt werden können. Jedoch wurden keine Transkripte des Operons *psbE/F/L/J* in weißen Plastiden gefunden, sodass *psbE* in Gerste höchstwahrscheinlich keinen NEP-Promotor besitzt (Zhelyazkova *et al.*, 2012b). Es scheint also unwahrscheinlich, dass in *Arabidopsis* ein NEP-Promotor für *psbE* existiert, womit die Ursache der Präzipitation ungeklärt bleibt. Dass es sich um ein Hintergrundrauschen aufgrund der hohen Abundanz des Transkripts handelte, ist unwahrscheinlich, da in diesem Fall auch eine Co-Präzipitation der abundanteren *psbA*- und anderer Transkripte zu erwarten gewesen wäre. Schließlich wurde RNA co-präzipitiert, die mit dem *trnG-trnR*-repräsentierenden

Abschnitt auf dem *microarray* hybridisierte. Die meisten tRNA-Gene werden durch PEP transkribiert, jedoch sind auch interne Promotoren bekannt, die theoretisch von NEP erkannt werden könnten. Beispielsweise werden *trnS* und *trnR* aus Spinat und Senf von einem internen Promotor aus transkribiert (Gruissem *et al.*, 1986; Neuhaus und Link, 1990; Nickelsen und Link, 1990; Liere und Link, 1994). Auf dem Tabakplastom sind *trnG* und *trnR* ähnlich wie in Spinat organisiert: beide Gene liegen stromabwärts der Gene *psbK* und *psbI* und auf dem Gegenstrang liegt *trnS-AGC*. Das Gen *trnG* wurde in Tabak gemeinsam den stromaufwärts liegenden *psbK* und *psbI* von PEP transkribiert, jedoch ohne *trnR* (Meng *et al.*, 1991). Außerdem fanden Meng *et al.* (1991) eine weitere TSS 6 bp stromaufwärts von *trnG*. Folgernd aus der Abundanz von *trnG*- und *psbK-I*-Transkripten wurde spekuliert, dass *trnG* hauptsächlich von seinem eigenen Promotor aus transkribiert wird, während die Co-Transkription möglicherweise aus einer mangelhaften Termination resultiert. Auch in Senf wurde sowohl eine mögliche Co-Transkription von *trnG* mit *psbK-I* gefunden, als auch eine eigene Startstelle für *trnG*, welcher allerdings ein PEP-Promotormotiv voransteht (Liere und Link, 1994). Auch in *Arabidopsis* sind diese Gene ähnlich organisiert: *psbK* und *psbI* liegen stromaufwärts von *trnG* und *trnR*. Anders als in Spinat und Tabak liegt *trnS* nicht auf dem Gegenstrang, sondern zwischen den *psb*-Genen und *trnG*. Aufgrund der Konservierung der Organisation wird vermutlich auch in *Arabidopsis* *trnG* von einem eigenen Promotor aus transkribiert und teilweise gemeinsam mit *psbK-I*. Diese Daten deuten auf eine PEP-abhängige Transkription von *trnG* hin, und somit darauf, dass im RIP-Chip nicht *trnG*-Transkripte sondern eher *trnR* präzipitiert wurde. Das Gen *trnR* könnte in *Arabidopsis* wie in Spinat und Senf einen internen Promotor besitzen und somit durch eine spezialisierte NEP transkribiert werden. Ebenso könnte *trnS* aus *Arabidopsis* wie in Spinat und Senf einen internen, möglicherweise durch NEP erkannten Promotor haben und mit den stromabwärts liegenden *trnG* und *trnR* co-transkribiert werden. Bisher wurde stromaufwärts von *trnS* allerdings nur ein potentiell PEP-Promotormotiv gefunden und keine entsprechende Transkriptionsstartstelle identifiziert (Dr. Karsten Liere, pers. Mitteilung).

Die Co-Präzipitation bekannter NEP-Transkripte und weiterer RNAs mit RpoTp veranschaulichte die direkte Beteiligung von RpoTp an der Transkription *in vivo*, wohingegen bisherige Nachweise der Transkriptionsaktivität *in vitro* erfolgten bzw. indirekt durch beispielsweise Transkriptlevel. Insgesamt wurden allerdings nur geringe Mengen von RNAs angereichert. Andere bekannte NEP-Transkripte wie *rpoB* oder *accD* konnten nicht nachgewiesen werden. Dies kann sowohl an der allgemein geringen Abundanz der Transkripte, als auch an einer für eine effiziente Fällung zu kurzen oder zu lockeren

Interaktion zwischen RNA-Polymerase und Transkript gelegen haben. Weiterhin spielt die geringe Menge an präzipitierter 3xFLAG-RpoTp selber sicherlich eine nicht unerhebliche Rolle bei der beobachteten geringen Effizienz dieser Analysen. Es müssten größere Mengen des Stromas eingesetzt werden und/oder die Versuche mit jüngerem Blattmaterial wiederholt werden, da NEP eher in frühen Phasen der Chloroplastenreifung von Bedeutung ist. Von besonderem Interesse wären RIP-Chips mit 3xFLAG-Tmp, da mit einem solchen Versuch gezeigt werden könnte, mit welchen RNAs RpoTmp zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung tatsächlich assoziiert ist. Entsprechende IPs mit anschließender RNA-Extraktion wurden durchgeführt. Allerdings zeigte bereits die *Western Blot* Analyse, dass die RNA-Polymerase nicht bzw. nur in sehr geringen Mengen präzipitiert wurde. Daher wurde auf die Hybridisierung mit dem *array* verzichtet. Gegebenenfalls müssten für eine entsprechende Analyse aus den ursprünglichen, durch die Transformation erzeugten Samen weitere transgene Linien, die eine stärkere Proteinexpression zeigen, identifiziert werden. Eine solche Linie wurde durch weiteres Durchmustern gefunden, allerdings war es für diese Linie 3xFLAG-Tmp TL4 nicht möglich ausreichend Samen für Versuche zu erzeugen, da 90 % der vereinzelt Keimlinge wenige Tage nach Aussaat starben. Vermutlich war die rekombinante Polymerasesequenz an einer Stelle im Genom integriert, an der sie die Entwicklung störte. Daher war es im Verlauf dieser Arbeit nicht mehr möglich entsprechende Versuche durchzuführen.

Die gezeigten Versuche machen deutlich, dass der bisherige Kenntnisstand hinsichtlich NEP- und PEP-transkribierter Gene nicht ausreicht, um ein genaues Modell der Arbeitsteilung dieser Enzyme zu erstellen. Daten von Zhelyazkova *et al.* (2012b) verdeutlichten, dass zahlreiche Promotoren noch nicht kartiert wurden und mehr Gene als bislang vermutet - sogar Photosynthesegene - zusätzliche NEP-Promotoren besitzen, die unter speziellen Bedingungen genutzt werden können. Folglich ist das Netzwerk der Regulation von NEP- und PEP-abhängiger Transkription komplex, und die zahlreichen, exogenen Faktoren regulieren nicht nur die Transkriptionsaktivität der jeweiligen Polymerase, sondern bestimmen im Zusammenspiel, welcher Polymerasetyp die Transkription eines Gens übernimmt.

5 Literatur

- Abdallah, F.; Salamini, F. und Leister, D. (2000): A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of Arabidopsis. *Trends Plant Sci* 5 [4], S. 141-142.
- Ahlert, D.; Stegemann, S.; Kahlau, S.; Ruf, S. und Bock, R. (2009): Insensitivity of chloroplast gene expression to DNA methylation. *Mol Genet Genomics* 282 [1], S. 17-24.
- Allison, L. A. (2000): The role of sigma factors in plastid transcription. *Biochimie* 82 [6-7], S. 537-548.
- Allison, L. A. und Maliga, P. (2001): Light-responsive and transcription-enhancing elements regulate the plastid psbD core promoter. *EMBO J* 14 [15], S. 3721-3730.
- Allison, L. A.; Simon, L. D. und Maliga, P. (1996): Deletion of rpoB reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *EMBO Journal* 15 [11], S. 2802-2809.
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. und Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25 [17], S. 3389-3402.
- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215 [3], S. 403-410.
- Antoshechkin, I. und Bogenhagen, D. F. (1995): Distinct roles for two purified factors in transcription of Xenopus mitochondrial DNA. *Mol Cell Biol* 15 [12], S. 7032-7042.
- Avni, A. und Edelman, M. (1991): Direct selection for paternal inheritance of chloroplasts in sexual progeny of Nicotiana. *Mol Gen Genet* 225 [2], S. 273-277.
- Azevedo, J., Courtois, F., Hakimi, M. A., Demarsy, E., Lagrange, T., Alcaraz, J. P., Jaiswal, P., Maréchal-Drouard, L. und Lerbs-Mache, S. (2008): Intraplastidial trafficking of a phage-type RNA polymerase is mediated by a thylakoid RING-H2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 [26], S. 9123-9128.
- Azevedo, J.; Courtois, F. und Lerbs-Mache, S. (2006): Sub-plastidial localization of two different phage-type RNA polymerases in spinach chloroplasts. *Nucleic Acids Research* 34 [2], S. 436-444.
- Baba, K.; Schmidt, J.; Espinosa-Ruiz, A.; Villarejo, A.; Shiina, T.; Gardestrom, P.; Sane, A. P. und Bhalerao, R. P. (2004): Organellar gene transcription and early seedling development are affected in the RpoT;2 mutant of Arabidopsis. *Plant J* 38 [1], S. 38-48.
- Baeza, L.; Bertrand, A.; Mache, R. und Lerbs-Mache, S. (1991): Characterization of a protein binding sequence in the promoter region of the 16S rRNA gene of the spinach chloroplast genome. *Nucleic Acids Res* 19 [13], S. 3577-3581.
- Baginsky, S.; Siddique, A. und Gruissem, W. (2004): Proteome analysis of tobacco bright yellow-2 (BY-2) cell culture plastids as a model for undifferentiated heterotrophic plastids. *J Proteome Res* 3 [6], S. 1128-1137.
- Baginsky, S.; Tiller, K. und Link, G. (1997): Transcription factor phosphorylation by a protein kinase associated with chloroplast RNA polymerase from mustard (Sinapis alba). *Plant Mol Biol* 34 [2], S. 181-9.
- Baginsky, S.; Tiller, K.; Pfannschmidt, T. und Link, G. (1999): PTK, the chloroplast RNA polymerase-associated protein kinase from mustard (Sinapis alba), mediates redox control of plastid in vitro transcription. *Plant Mol Biol* 39 [5], S. 1013-1023.
- Barkan, A. (2011): Expression of Plastid Genes: Organelle-Specific Elaborations on a Prokaryotic Scaffold. *Plant Physiol* 155 [4], pp. 1520-1532.
- Barkan, A. und Goldschmidt-Clermont, M. (2000): Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression. *Biochimie* 82 [6-7], S. 559-572.

- Barsan, C.; Sanchez-Bel, P.; Rombaldi, C.; Egea, I.; Rossignol, M.; Kuntz, M.; Zouine, M.; Latché, A.; Bouzayen, M. und Pech, J.-C. (2010) Characteristics of the tomato chromoplast revealed by proteomic analysis. *J Exp Bot* 61 [9], S. 2413–2431.
- Baumgartner, B. J.; Rapp, J. C und Mullet, J. E. (1993): Plastid genes encoding the transcription/translation apparatus are differentially transcribed early in barley 125 (*Hordeum vulgare*) chloroplast development: evidence for selective stabilization of psbA mRNA. *Plant Physiol* 101 [3], S. 781-791.
- Beardslee, T. A.; Roy-Chowdhury, S.; Jaiswal, P.; Buhot, L.; Lerbs-Mache, S.; Stern, D. B. und Allison, L. A. (2002): A nucleus-encoded maize protein with sigma factor activity accumulates in mitochondria and chloroplasts. *Plant J* 31 [2], S. 199-209.
- Bendich, A. J. (2004): Circular chloroplast chromosomes: the grand illusion. *Plant Cell* 16 [7], S. 1661-1666.
- Bensing, B. A.; Meyer, B. J. und Dunny, G. M. (1996): Sensitive detection of bacterial transcription initiation sites and differentiation from RNA processing sites in the pheromone-induced plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*. *PNAS* 93 [15], S. 7794-7799.
- Bertani, G. (1951): Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62 [3], S. 293-300.
- Bisanz, C.; Bégot, L.; Carol, P.; Perez, P.; Bligny, M.; Pesey, H.; Gallois, J. L.; Lerbs-Mache, S. und Mache R. (2003): The Arabidopsis nuclear DAL gene encodes a chloroplast protein which is required for the maturation of the plastid ribosomal RNAs and is essential for chloroplast differentiation. *Plant Mol Biol* 51 [5], S. 651-663.
- Bligny, M.; Courtois, F.; Thaminy, S.; Chang, C. C.; Lagrange, T.; Baruah-Wolff, J.; Stern, D. und Lerbs-Mache, S. (2000): Regulation of plastid rDNA transcription by interaction of CDF2 with two different RNA polymerases. *EMBO J* 19 [8], S. 1851-1860.
- Bock, R. (2007): Plastid biotechnology: prospects for herbicide and insect resistance, metabolic engineering and molecular farming. *Curr Opin Biotechnol* 18 [2], S. 100-6.
- Bogenhagen, D. F. (1996): Interaction of mtTFB and mtRNA polymerase at core promoters for transcription of *Xenopus laevis* mtDNA. *J Biol Chem* 271 [20], S. 12036-12041.
- Bohne, A.-V. (2009): Analyse von Komponenten der organellären Transkriptionsmaschinerien aus *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum*. Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.
- Bohne, A.-V.; Ruf, S.; Börner, T. und Bock, R. (2007): Faithful transcription initiation from a mitochondrial promoter in transgenic plastids. *Nucleic Acids Res* 35 [21], S. 7256-7266.
- Bollenbach, T. J.; Sharwood, R. E.; Gutierrez, R.; Lerbs-Mache, S. und Stern, D. B. (2009): The RNA-binding proteins CSP41a and CSP41b may regulate transcription and translation of chloroplast-encoded RNAs in Arabidopsis. *Plant Mol Biol.* 69 [5], S. 541-552.
- Bollenbach, T. J.; Tatman, D. A. und Stern, D. B. (2003): CSP41a, a multifunctional RNA-binding protein, initiates mRNA turnover in tobacco chloroplasts. *Plant J* 36 [6], S. 842-852.
- Bookjans, G.; Stummann, B. M. und Henningsen, K. W. (1984): Preparation of chloroplast DNA from pea plastids isolated in a medium of high ionic strength. *Anal Biochem* 141 [1], S. 244-247.
- Borsellino, L. (2012): Influence of light and cytokinin on organellar phage-type RNA polymerase transcript levels and transcription of organellar genes in *Arabidopsis thaliana*. Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.

- Boudreau, E.; Turmel, M.; Goldschmidt-Clermont, M.; Rochaix, J. D.; Sivan, S.; Michaels, A. und Leu, S. (1997): A large open reading frame (orf1995) in the chloroplast DNA of *Chlamydomonas reinhardtii* encodes an essential protein. *Mol Gen Genet* 253 [5], S. 649-653.
- Bown, J.; Barne, K.; Minchin, S. und Busby, S. (1997): Extended -10 promoters. *Nucleic Acids Mol Biol* 11, S 41-52.
- Boyer, S. K. und Mullet, J. E. (1988): Sequence and transcript map of barley chloroplast psbA gene. *Nucleic Acids Res* 16 [16], S. 8184.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, S. 248-254.
- Bradley, D. und Gatenby, A. A. (1985): Mutational analysis of the maize chloroplast ATPase-beta subunit gene promoter: the isolation of promoter mutants in *E. coli* and their characterization in a chloroplast *in vitro* transcription system. *Embo J* 4 [13B], S. 3641-3648.
- Braukmann, T.; Kuzmina, M. und Stefanovic, S. (2013): Plastid genome evolution across the genus *Cuscuta* (Convolvulaceae): two clades within subgenus *Grammica* exhibit extensive gene loss. *J Exp Bot* [Epub doi:10.1093/jxb/ers391]
- Briat, J. F.; Laulhere, J. P. und Mache, R. (1979): Transcription activity of a DNA-protein complex isolated from spinach plastids. *Eur J Biochem* 98 [1], S. 285-292.
- Broyles, S. S. und Moss, B. (1988): DNA-dependent ATPase activity associated with vaccinia virus early transcription factor. *J Biol Chem* 263 [22], S. 10761-5.
- Bülow, S. und Link, G. (1988): Sigma-like activity from mustard (*Sinapis alba* L.) chloroplasts conferring DNA-binding and transcription specificity to *E. coli* core RNA polymerase. *Plant Mol Biol* 10 [4], S. 349-357.
- Bünger, W. und Feierabend, J. (1980): Capacity for RNA synthesis in 70S ribosomedeficient plastids of heat-bleached rye leaves. *Planta* 149 [2], S. 163-169.
- Cahoon, A. B.; Harris, F. M. und Stern, D. B. (2004): Analysis of developing maize plastids reveals two mRNA stability classes correlating with RNA polymerase type. *EMBO Rep* 5 [8], S. 801-806.
- Cermakian, N.; Ikeda, T. M.; Cedergren, R. und Gray, M. W. (1996): Sequences homologous to yeast mitochondrial and bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases are widespread throughout the eukaryotic lineage. *Nucleic Acids Res* 24 [4], S. 648-654.
- Cermakian, N.; Ikeda, T. M.; Miramontes, P.; Lang, B. F.; Gray, M. W. und Cedergren, R. (1997): On the evolution of the single-subunit RNA polymerases. *J Mol Evol* 45 [6], S. 671-681.
- Chang, C. C.; Sheen, J.; Bligny, M.; Niwa, Y.; Lerbs-Mache, S. und Stern, D. B. (1999): Functional analysis of two maize cDNAs encoding T7-like RNA polymerases. *Plant Cell* 11 [5], S. 911-926.
- Chateigner-Boutin, A. L. und Small, I. (2010): Plant RNA editing. *RNA Biol* 7 [2], S. 213-9.
- Cheetham G. M. und Steitz T. A. (2000): Insights into transcription: structure and function of single-subunit DNA-dependent RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol.* 10 [1], S. 117-123.
- Chen, P.-Y.; Wang, C.-K.; Soong, S.-C. und To, K.-Y. (2003): Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. *Molecular Breeding* 11, S. 287-293.
- Cheng, Y. S.; Lin, C. H. und Chen, L. J. (1997): Transcription and processing of the gene for spinach chloroplast threonine tRNA in a homologous *in vitro* system. *Biochem Biophys Res Commun* 233 [2], S. 380-385.

- Chun, L.; Kawakami, A. und Christopher, D. A. (2001): Phytochrome A mediates blue light and UVA-dependent chloroplast gene transcription in green leaves. *Plant Physiology* 125 [4], S. 1957-1966.
- Coburn, G. A.; Miao, X.; Briant, D. J. und Mackie, G. A. (1999): Reconstitution of a minimal RNA degradosome demonstrates functional coordination between a 3' exonuclease and a DEAD-box RNA helicase. *Genes Dev* 13 [19], S. 2594-2603.
- Cohen, S. N. und McDowall, K. J. (1997): RNase E: still a wonderfully mysterious enzyme. *Mol Microbiol* 23 [6], S. 1099-1106.
- Conaway, R. C. und Conaway, J. W. (1989): An RNA polymerase II transcription factor has an associated DNA-dependent ATPase (dATPase) activity strongly stimulated by the TATA region of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 [19], S. 7356-7360.
- Corpet, F. (1988): Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16 [22], S. 10881-10890.
- Courtois, F.; Merendino, L.; Demarsy, E.; Mache, R. und Lerbs-Mache, S. (2007): Phage-Type RNA Polymerase RPOTmp Transcribes the *rrn* Operon from the PC Promoter at Early Developmental Stages in Arabidopsis. *Plant Physiology* 145 [3], S. 712-721.
- Cui L.; Veeraraghavan N.; Richter A.; Wall K.; Jansen R. K.; Leebens-Mack J.; Makalowska I. und dePamphilis C. W. (2006): ChloroplastDB: the Chloroplast Genome Database. *Nucleic Acids Res.* 34 [Database issue], S. D692-6.
- Czechowski, T.; Stitt, M.; Altmann, T.; Udvardi, M. K. und Scheible, W. R. (2005): Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol* 139 [1], S. 5-17.
- Däschner K.; Couée I. und Binder S. (2001): The mitochondrial isovaleryl-coenzyme A dehydrogenase of Arabidopsis oxidizes intermediates of leucine and valine catabolism. *Plant Physiol* 126 [2], S. 601-612.
- De Santis-Maclossek, G.; Kofer, W.; Bock, A.; Schoch, S.; Maier, R. M.; Wanner, G.; Rudiger, W.; Koop, H.-U. und Herrmann, R. G. (1999): Targeted disruption of the plastid RNA polymerase genes *rpoA*, *B* and *C1*: Molecular biology, biochemistry and ultrastructure. *Plant J* 18 [5], S. 477-489.
- Delwiche, C. F.; Kuhsel, M. und Palmer, J. D. (1995): Phylogenetic analysis of *tufA* sequences indicates a cyanobacterial origin of all plastids. *Mol Phylogenet Evol* 4 [2], S. 110-128.
- Demarsy, E.; Buhr, F.; Lambert, E. und Lerbs-Mache, S. (2012): Characterization of the plastid-specific germination and seedling establishment transcriptional programme. *J Exp Bot* 63 [2], S. 925-939.
- Demarsy, E.; Courtois, F.; Azevedo, J.; Buhot, L. und Lerbs-Mache, S. (2006): Building up of the plastid transcriptional machinery during germination and early plant development. *Plant Physiol* 142 [3], S. 993-1003.
- Deng, X. W. und Gruissem, W. (1987): Control of plastid gene expression during development: the limited role of transcriptional regulation. *Cell* 49 [3], S. 379-387.
- Deshpande, A. P. und Patel, S. S. (2012): Mechanism of transcription initiation by the yeast mitochondrial RNA polymerase. *Biochim Biophys Acta* 1819 [9-10], S. 930-938.
- Dhingra, A.; Bies, D. H.; Lehner, K. R. und Folta K. M. (2006): Green light adjusts the plastid transcriptome during early photomorphogenic development. *Plant Physiol* 142 [3], S. 1256-1266.
- Dower, W. J.; Miller, J. F. und Ragsdale, C. W. (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation, *Nucleic Acids Res* 16 [13], S. 6127-6145.
- Downie, S. R.; Katz-Downie, D. S.; Wolfe, K. H.; Calie, P. J. und Palmer, J. D. (1994): Structure and evolution of the largest chloroplast gene (ORF2280): internal plasticity and multiple gene loss during angiosperm evolution. *Curr Genet* 25 [4], S. 367-378.

- Drescher, A.; Ruf, S.; Calsa, T.; Carrer, H. und Bock, R. (2000): The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. *Plant J* 22 [2], S. 97-104.
- DuBell, A. N. und Mullet, J. E. (1995): Differential transcription of pea chloroplast genes during light-induced leaf development. *Plant Physiol* 109 [1], S. 105-112.
- Dyall, S. D.; Brown, M. T. und Johnson, P. J. (2004): Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. 304 [5668], S. 253-257.
- Einhauer, A. und Jungbauer, A. (2001): The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J Biochem Biophys Methods* 49 [1-3], S. 455-65.
- Eisermann, A.; Tiller, K. und Link, G. (1990): In vitro transcription and DNA binding characteristics of chloroplast and etioplast extracts from mustard (*Sinapis alba*) indicate differential usage of the psbA promoter. *Embo J* 9 [12], S. 3981-3987.
- Emanuel, C.; von Groll, U.; Muller, M.; Börner, T. und Weihe, A. (2006): Development- and tissue-specific expression of the RpoT gene family of Arabidopsis encoding mitochondrial and plastid RNA polymerases. *Planta* 223 [5], S. 1-12.
- Emanuel, C.; Weihe, A.; Graner, A.; Hess, W. R. und Börner, T. (2004): Chloroplast development affects expression of phage-type RNA polymerases in barley leaves. *Plant J* 38 [3], S. 460-472.
- Emanuelsson, O.; Nielsen, H.; Brunak, S. und von Heijne, G. (2000): Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300 [4], S. 1005-1016.
- Ems, S. C.; Morden, C. W.; Dixon, C. K.; Wolfe, K. H.; DePamphilis, C. W. und Palmer, J. D. (1995): Transcription, splicing and editing of plastid RNAs in the nonphotosynthetic plant *Epifagus virginiana*. *Plant Mol Biol* 29 [4], S. 721-33.
- Ellis, R. J. und Hartley, M. R. (1971): Sites of synthesis of chloroplast proteins. *Nature* 233 [5320], S. 193-196.
- Evan, G. I.; Lewis, G. K.; Ramsay, G. und Bishop, J. M. (1985): Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* 5 [12], S. 3610-3616.
- Falk, J.; Schmidt, A. und Krupinska, K. (1993): Characterization of plastid DNA transcription in ribosome deficient plastids of heat-bleached barley leaves. *Journal of Plant Physiology* 141 [2], S. 176-181.
- Falkenberg, M.; Gaspari, M.; Rantanen, A.; Trifunovic, A.; Larsson, N. G. und Gustafsson, C. M. (2002): Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet* 31 [3], S. 289-294.
- Feiler, H. S.; Desprez, T.; Santoni, V.; Kronenberger, J.; Caboche, M. und Traas, J. (1995): The higher plant *Arabidopsis thaliana* encodes a functional CDC48 homologue which is highly expressed in dividing and expanding cells. *EMBO J* 14 [22], S. 5626-5637.
- Fey, V.; Wagner, R.; Bräutigam, K.; Wirtz, M.; Hell, R.; Dietzmann, A.; Leister, D.; Oelmüller, R. und Pfannschmidt, T. (2005): Retrograde plastid redox signals in the expression of nuclear genes for chloroplast proteins of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 280 [7], S. 5318-5328.
- Fisher, R. P. und Clayton, D. A. (1988): Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. *Mol Cell Biol* 8 [8], S. 3496-3509.
- Fujiwara, M.; Nagashima, A.; Kanamaru, K.; Tanaka, K. und Takahashi, H. (2000): Three new nuclear genes, *sigD*, *sigE* and *sigF*, encoding putative plastid RNA polymerase σ factors in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 481 [1], S. 47-52.
- Galli, G.; Hofstetter, H. und Birnstil, M. L. (1981): Two conserved blocks within eukaryotic tRNA genes are major promoter elements. *Nature* 294, S. 626-631.

- Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M. R.; Appel, R. D. und Bairoch A. (2005): Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In Walker, J. M. (Hrsg.), The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005), S. 571-607
- Gatenby, A. A.; Castleton, J. A. und Saul, M. W. (1981): Expression in *E. coli* of maize and wheat chloroplast genes for large subunit of ribulose biphosphate carboxylase. *Nature* 291 [5811], S. 117-121.
- Geiduschek, E. P.; Bardeleben, C.; Joazeiro, C. A.; Kassavetis, G. A. und Whitehall, S. (1995): Yeast RNA polymerase III: transcription complexes and RNA synthesis. *Braz J Med Biol Res* 28 [2], S. 147-159.
- Gharahdaghi, F.; Weinberg, C. R.; Meagher, D. A.; Imai, B. S. und Mische, S. M. (1999): Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* 20 [3], S. 601-605.
- Gray, M. W. (1992): The endosymbiont hypothesis revisited. *Int Rev Cytol* 141, S. 233-357.
- Gray, M. W. (1999): Evolution of organellar genomes. *Curr Opin Genet Dev* 9 [6], S. 678-87.
- Gray M. W.; Burger G. und Lang B. F. (1999): Mitochondrial evolution. *Science* 283 [5407], S. 1476-1481.
- Greenberg, B. M.; Gaba, V.; Canaani, O.; Malkin, S.; Mattoo, A. K. und Edelman, M. (1989): Separate photosensitizers mediate degradation of the 32-kDa photosystem II reaction center protein in the visible and UV spectral regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 [17], S. 6617-6620.
- Greenleaf, A. L.; Kelly, J. L. und Lehman, I. R. (1986): Yeast RPO41 gene product is required for transcription and maintenance of the mitochondrial genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83[10], S. 3391-3394.
- Gruissem, W und Tonkyn, J. C. (1993): Control mechanisms of plastid gene expression. *Critical Reviews in Plant Sciences* 12, S. 19-55.
- Gruissem, W.; Elsner-Menzel, C.; Latshaw, S.; Narita, J. O.; Schaffer, M. A. und Zurawski, G. (1986): A subpopulation of spinach chloroplast tRNA genes does not require upstream promoter elements for transcription. *Nucleic Acids Res* 14 [19], S. 7541-7556.
- Guo, J.; Xu, W. und Ma, M. (2012): The assembly of metals chelation by thiols and vacuolar compartmentalization conferred increased tolerance to and accumulation of cadmium and arsenic in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *J Hazard Mater* 199-200, S. 309-313.
- Hagemann, R. (1992): Plastid genetics in higher plants. In *Cell Organelles*, Herrmann, R. G. (Hrsg.), S. 66–96. Wien, New York: Springer-Verlag
- Hajdukiewicz, P. T.; Allison, L. A. und Maliga, P. (1997): The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *EMBO J* 16 [13], S. 4041-4048.
- Hakimi, M.A.; Privat, I.; Valay, J.G. und Lerbs-Mache, S. (2000): Evolutionary conservation of Cterminal domains of primary sigma70-type transcription factors between plants and bacteria. *J Biol Chem* 275 [13], S. 9215-9221.
- Han, C. D.; Patrie, W.; Polacco, M. und Coe, E. H. (1993): Aberrations in plastid transcripts and deficiency of plastid DNA in striped and albino mutants in maize. *Planta* 191, S. 552-563.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166 [4], S. 557-580.
- Hanaoka, M.; Kanamaru, K.; Fujiwara, M.; Takahashi, H. und Tanaka, K. (2005): Glutamyl-tRNA mediates a switch in RNA polymerase use during chloroplast biogenesis, *EMBO Reports* 6 [6], S. 545-550.

- Hanover, J. A. (1988): Intracellular transport of VSV G protein occurs in cells lacking a nuclear envelope. *Biochem Biophys Res Commun* 152 [1], S. 469-476.
- Hara, K.; Morita, M.; Takahashi, R.; Sugita, M.; Kato, S. und Aoki, S. (2001): Characterization of two genes, *Sig1* and *Sig2*, encoding distinct plastid sigma factors(1) in the moss *Physcomitrella patens*: phylogenetic relationships to plastid sigma factors in higher plants. *FEBS Letters* 499 [1-2], S. 87-91.
- Harley, C. B. und Reynolds, R. P. (1987): Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 15 [5], S. 2343-2361.
- Hashimoto, M.; Endo, T.; Peltier, G.; Tasaka, M. und Shikanai, T. (2003): A nucleus-encoded factor, CRR2, is essential for the expression of chloroplast *ndhB* in *Arabidopsis*. *Plant J* 36 [4], S. 541-549.
- Hayes, R.; Kudla, J. und Gruissem, W. (1999): Degrading chloroplast mRNA: the role of polyadenylation. *Trends Biochem Sci* 24 [5], S. 199-202.
- Hayes, R.; Kudla, J.; Schuster, G.; Gabay, L.; Maliga, P. und Gruissem, W. (1996): Chloroplast mRNA 3'-end processing by a high molecular weight protein complex is regulated by nuclear encoded RNA binding proteins. *EMBO J* 15 [5], S. 1132-1141.
- Hedtke, B.; Börner, T. und Weihe, A. (1997): Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis*. *Science* 277 [5327], S. 809-811.
- Hedtke, B.; Börner, T. und Weihe, A. (2000): One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO Reports* 1 [5], S. 435-440.
- Hedtke, B.; Legen, J.; Weihe, A.; Herrmann, R. G. und Börner, T. (2002): Six active phage-type RNA polymerase genes in *Nicotiana tabacum*. *Plant Journal* 30 [6], S. 625-637.
- Hedtke, B.; Meixner, M.; Gillandt, S.; Richter, E.; Börner, T. und Weihe, A. (1999): Green fluorescent protein as a marker to investigate targeting of organellar RNA polymerases of higher plants *in vivo*. *Plant Journal* 17 [5], S. 557-561.
- Hertel, S. (2009): Aspekte der plastidären Transkription: Der Einfluss des Phytohormons Cytokinin und *in vivo*-Analysen zur Regulation des *rpoB*-Operons. Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.
- Hess, W. R. und Börner, T. (1999): Organellar RNA polymerases of higher plants. *Int Rev Cytol* 190, S. 1-59.
- Hess, W. R.; Hübschmann, T. und Börner, T. (1993): Ribosome-deficient plastids of *albostrians* barley: extreme representatives of non-photosynthetic plastids. *Endocytobiosis Cell Res* 10, S. 65-80.
- Hirata, N.; Yonekura, D.; Yanagisawa, S. und Iba, K. (2004): Possible involvement of the 5'-flanking region and the 5'UTR of plastid *accD* gene in NEP-dependent transcription. *Plant Cell Physiol* 45 [2], S. 176-186.
- Hiratsuka, J.; Shimada, H.; Whittier, R.; Ishibashi, T.; Sakamoto, M.; Mori, M.; Kondo, C.; Honji, Y.; Sun, C. R.; Meng, B. Y.; Li, Y.-O.; Kanno, A.; Nishizawa, Y.; Hirai, A.; Shinozaki, K. und Sugiura, M. (1989): The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol Gen Genet* 217 [2-3], S. 185-194.
- Hoffer, P.H. und Christopher, D.A. (1997): Structure and blue-light-responsive transcription of a chloroplast *psbD* promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 115 [1], S. 213-222.
- Homann, A. und Link, G. (2003): DNA-binding and transcription characteristics of three cloned sigma factors from mustard (*Sinapis alba* L.) suggest overlapping and distinct roles in plastid gene expression. *Eur J Biochem* 270 [6], S. 1288- 1300.
- Hopkins, W. G. und Elfman, B. (1984): Temperature-induced chloroplast ribosome deficiency in virescent maize. *J Hered* 75 [3], S. 207-211.

- Hricová, A.; Quesada, V. und Micol, J. L. (2006): The SCABRA3 nuclear gene encodes the plastid RpoTp RNA polymerase, which is required for chloroplast biogenesis and mesophyll cell proliferation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 141 [3], S. 942-956.
- Hu, J. und Bogorad, L. (1990): Maize chloroplast RNA polymerase: the 180-, 120-, and 38-kilodalton polypeptides are encoded in chloroplast genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 [4], S. 1531-1535.
- Hu, J.; Troxler, R. F. und Bogorad, L. (1991): Maize chloroplast RNA polymerase: the 78-kilodalton polypeptide is encoded by the plastid *rpoC1* gene. *Nucleic Acids Res* 19 [12], S. 3431-3434.
- Hübschmann, T. und Börner, T. (1998): Characterisation of transcript initiation sites in ribosomedeficient barley plastids. *Plant Mol Biol* 36 [3], S. 493-496.
- Hudson, G. S.; Holton, D. A.; Whitfeld, P. R. und Bottomley, W. (1988): Spinach chloroplast *rpoBC* genes encode three subunits of the chloroplast RNA polymerase. *J Mol Biol* 200 [4], S. 639-654.
- Ikeda, T. M. und Gray, M. W. (1999): Identification and characterization of T3/T7 bacteriophage-like RNA polymerase sequences in wheat. *Plant Mol Biol* 40 [4], S. 567-578.
- Inada, H.; Kusumi, K.; Nishimura, M. und Iba, K. (1996): Specific expression of the chloroplast gene for RNA polymerase (*rpoB*) at an early stage of leaf development in rice. *Plant Cell Physiol* 37 [2], S. 229-32.
- Inada, H.; Seki, M.; Morikawa, H.; Nishimura, M. und Iba, K. (1997): Existence of three regulatory regions each containing a highly conserved motif in the promoter of plastid-encoded RNA polymerase gene (*rpoB*). *Plant J* 11 [4], S. 883-890.
- Iratni, R.; Baeza, L.; Andreeva, A.; Mache, R. und Lerbs-Mache, S. (1994): Regulation of rDNA transcription in chloroplasts: promoter exclusion by constitutive repression. *Genes Dev* 8 [23], S. 2928-2938.
- Iratni, R. ; Diederich, L. ; Harrak, H. ; Bligny, M. und Lerbs-Mache, S. (1997): Organ-specific transcription of the *rrn* operon in spinach plastids. *J Biol Chem* 272 [21], S. 13676-13682.
- Ishihama, A. (2000): Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol* 54, S. 499-518.
- Isono, K. ; Niwa, Y. ; Satoh, K. und Kobayashi, H. (1997a): Evidence for transcriptional regulation of plastid photosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Physiol* 114 [2], S. 623-630.
- Isono, K.; Shimizu, M.; Yoshimoto, K.; Niwa, Y.; Satoh, K.; Yokota, A. und Kobayashi, H. (1997b): Leaf-specifically expressed genes for polypeptides destined for chloroplasts with domains of sigma70 factors of bacterial RNA polymerases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 [26], S. 14948-14953.
- Jahn, D. (1992): Expression of the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast tRNA(Glu) gene in a homologous *in vitro* transcription system is independent of upstream promoter elements. *Arch Biochem Biophys* 298 [2], S. 505-513.
- Jaehning, J.A. (1993): Mitochondrial transcription: is a pattern emerging? *Molecular Microbiol* 8 [1], S. 1-4.
- Jang, S. H. und Jaehning, J. A. (1991): The yeast mitochondrial RNA polymerase specificity factor, MTF1, is similar to bacterial sigma factors. *J Biol Chem* 266 [33], S. 22671-22677.
- Jansen R. K.; Raubeson L. A.; Boore J. L.; dePamphilis C. W.; Chumley T. W.; Haberle R. C.; Wyman S. K.; Alverson A. J.; Peery R.; Herman S. J.; Fourcade H. M.; Kuehl J. V.; McNeal J. R.; Leebens-Mack J. und Cui L. (2005): Methods for obtaining and analyzing whole chloroplast genome sequences. *Methods Enzymol* 395, S. 348-84.

- Jefferson R. A. (1987): Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5, S. 387–405.
- Kaberdin, V. R.; Miczak, A.; Jakobsen, J. S.; Lin-Chao, S.; McDowall, K. J. und von Gabain A. (1998): The endoribonucleolytic N-terminal half of *Escherichia coli* RNase E is evolutionarily conserved in *Synechocystis* sp. and other bacteria but not the C-terminal half, which is sufficient for degradosome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [20], S. 11637-11642.
- Kabeya, Y. und Sato, N. (2005): Unique translation initiation at the second AUG codon determines mitochondrial localization of the phage-type RNA polymerases in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiol* 138 [1], S. 369-382.
- Kabeya, Y.; Hashimoto, K. und Sato, N. (2002): Identification and characterization of two phage-type RNA polymerase cDNAs in the moss *Physcomitrella patens*: implication of recent evolution of nuclear-encoded RNA polymerase of plastids in plants. *Plant Cell Physiol* 43 [3], S. 245-255.
- Kanamaru, K.; Fujiwara, M.; Seki, M.; Katagiri, T.; Nakamura, M.; Mochizuki, N.; Nagatani, A.; Shinozaki, K.; Tanaka, K. und Takahashi, H. (1999): Plastidic RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 40 [8], S. 832-842.
- Kaneko, T.; Sato, S.; Kotani, H.; Tanaka, A.; Asamizu, E.; Nakamura, Y.; Miyajima, N.; Hirose, M.; Sugiura, M.; Sasamoto, S.; Kimura, T.; Hosouchi, T.; Matsuno, A.; Muraki, A.; Nakazaki, N.; Naruo, K.; Okumura, S.; Shimpo, S.; Takeuchi, C.; Wada, T.; Watanabe, A.; Yamada, M.; Yasuda, M. und Tabata, S. (1996): Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Research* 3 [3], S. 109-136.
- Kapoor, S. und Sugiura, M. (1999): Identification of two essential sequence elements in the nonconsensus Type II *PatpB*-290 plastid promoter by using plastid transcription extracts from cultured tobacco BY-2 cells. *Plant Cell* 11 [9], S. 1799-1810.
- Kapoor, S.; Suzuki, J. Y. und Sugiura, M. (1997): Identification and functional significance of a new class of non-consensus-type plastid promoters. *Plant Journal* 11 [2], S. 327-337.
- Karcher, D.; Köster, D.; Schadach, A.; Klevesath, A. und Bock, R. (2009): The *Chlamydomonas* chloroplast HLP protein is required for nucleoid organization and genome maintenance. *Mol Plant* 2 [6], S. 1223-1232.
- Karradt, A.; Sobanski, J.; Mattow, J.; Lockau, W. und Baier, K. (2008): NblA, a key protein of phycobilisome degradation, interacts with ClpC, a HSP100 chaperone partner of a cyanobacterial Clp protease. *J Biol Chem*. 283 [47], S. 32394-403.
- Kato, Y. und Sakamoto, W. (2009): Protein quality control in chloroplasts: a current model of D1 protein degradation in the photosystem II repair cycle. *J Biochem* 146 [4], S. 463-469.
- Kavanagh, T. A.; Thanh, N. D.; Lao, N. T.; McGrath, N.; Peter, S. O.; Horváth, E. M.; Dix, P. J. und Medgyesy, P. (1999): Homeologous plastid DNA transformation in tobacco is mediated by multiple recombination events. *Genetics* 152 [3], S. 1111-1122.
- Ke, J.; Wen, T. N.; Nikolau, B. J. und Wurtele, E. S. (2000): Coordinate regulation of the nuclear and plastidic genes coding for the subunits of the heteromeric acetyl-coenzyme A carboxylase. *Plant Physiol* 122 [4], S. 1057-1071.
- Kestermann, M.; Neukirchen, S.; Kloppstech, K. und Link, G. (1998): Sequence and expression characteristics of a nuclear-encoded chloroplast sigma factor from mustard (*Sinapis alba*). *Nucleic Acids Res* 26 [11], S. 2747-2753.
- Kim, M.; Christopher, D. A. und Mullet, J. E. (1999a): ADP-Dependent phosphorylation regulates association of a DNA-binding complex with the barley chloroplast psbD blue-light-responsive promoter. *Plant Physiol* 119 [2], S. 663-670.

- Kim, M.; Thum, K.E.; Morishige, D.T. und Mullet, J.E. (1999b): Detailed architecture of the barley chloroplast *psbD-psbC* blue light-responsive promoter. *J Biol Chem* 274 [8], S. 4684-4692.
- Kim, J. W.; Park, J. K.; Kim, B. H.; Lee, J. S. und Sim, W. S. (2002): Molecular analysis of the accumulation of the transcripts of the large subunit gene of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by light. *Mol Cells* 14 [2], S. 281-287.
- Klein, R. R. und Mullet, J. E. (1990): Light-induced transcription of chloroplast genes. *psbA* transcription is differentially enhanced in illuminated barley. *J Biol Chem.* 265 [4], S. 1895-1902.
- Kobayashi, Y.; Dokiya, Y.; Kumazawa, Y. und Sugita, M. (2002): Non-AUG translation initiation of mRNA encoding plastid-targeted phage-type RNA polymerase in *Nicotiana sylvestris*. *Biochem Biophys Res Commun* 299 [1], S. 57-61.
- Kobayashi, Y.; Dokiya, Y. und Sugita, M. (2001): Dual targeting of phage-type RNA polymerase to both mitochondria and plastids is due to alternative translation initiation in single transcripts. *Biochem Biophys Res Commun* 289 [5], S. 1106-1113.
- Kode, V.; Mudd, E. A.; Iamtham, S. und Day, A. (2005): The tobacco plastid *accD* gene is essential and is required for leaf development. *Plant J* 44 [2], S. 237-244.
- Krause, K.; Berg, S. und Krupinska, K. (2003): Plastid transcription in the holoparasitic plant genus *Cuscuta*: parallel loss of the *rrn16* PEP-promoter and of the *rpoA* and *rpoB* genes coding for the plastid-encoded RNA polymerase. *Planta* 216 [5], S. 815-823.
- Krause, K.; Maier, R. M.; Kofer, W.; Krupinska, K. und Herrmann, R. G. (2000): Disruption of plastid-encoded RNA polymerase genes in tobacco: expression of only a distinct set of genes is not based on selective transcription of the plastid chromosome. *Mol Gen Genet* 263 [6], S. 1022-1030.
- Kreft, S. G. und Nassal, M. (2003): hRUL138, a novel human RNA-binding RING-H2 ubiquitin-protein ligase. *J Cell Sci* 116 [Pt 4], S. 605-616.
- Kuhlemeier, C. (1992): Transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression in plants. *Plant Mol Biol.* 19 [1], S. 1-14.
- Kühn, K.; Bohne, A.-V.; Liere, K.; Weihe, A. und Börner, T. (2007): *Arabidopsis* phage-type RNA polymerases: accurate *in vitro* transcription of organellar genes. *Plant Cell* 19 [3], S. 959-971.
- Kühn, K.; Richter, U.; Meyer, E.; Delannoy, E.; deLongevialle, A. F.; O'Toole, N.; Börner, T.; Millar, A.; Small, I. und Whelan, J. (2009): Phage-type RNA polymerase RPOTmp performs gene-specific transcription in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *PlantCell* 21 [9], S. 2762-2779.
- Kunst, L. (1998): Preparation of physiologically active chloroplasts from *Arabidopsis*. *Methods Mol Biol* 82, S. 43-48.
- Kurg. R.; Parik, J.; Juronen, E.; Sedman, T.; Abroi, A.; Liiv, I.; Langel, U. und Ustav, M. (1999): Effect of bovine papillomavirus E2 protein-specific monoclonal antibodies on papillomavirus DNA replication. *J Virol* 73 [6], S. 4670-4677.
- Kuroda, H. und Maliga, P. (2003): The plastid *clpP1* protease gene is essential for plant development. *Nature* 425 [6953], S. 86-89.
- Kuroiwa, T. (2010): Mechanisms of organelle division and inheritance and their implications regarding the origin of eukaryotic cells. *Proc Jpn Acad Ser. B* 86, S. 455-470.
- Kusumi, K.; Yara, A.; Mitsui, N.; Tozawa, Y. und Iba, K. (2004): Characterization of a rice nuclearencoded plastid RNA polymerase gene *OsRpoTp*. *Plant Cell Physiol* 45 [9], S. 1194-1201.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 [5259], S. 680-685.
- Lahiri, S. D. und Allison, L. A. (2000): Complementary expression of two plastid-localized sigma-like factors in maize. *Plant Physiol* 123 [3], S. 883-894.

- Lazo, G. R.; Stein, P. A. und Ludwig, R. A. (1991): A DNA transformation-competent Arabidopsis genomic library in Agrobacterium. *Biotechnology (N Y)* 9 [10], S. 963-967.
- Lee, P. C.; Umeyama, T. und Horinouchi, S. (2002): *afsS* is a target of AfsR, a transcriptional factor with ATPase activity that globally controls secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 43 [6], S. 1413-1430.
- Legen, J. (2002): Gene expression in plastids of higher plants: evolutionary and functional aspects of different RNA polymerases - coordinated assembly of multiproteincomplexes. LMU, München.
- Legen, J.; Kemp, S.; Krause, K.; Profanter, B.; Herrmann, R. G. und Maier, R. M. (2002): Comparative analysis of plastid transcription profiles of entire plastid chromosomes from tobacco attributed to wild-type and PEP-deficient transcription machineries. *Plant J* 31 [2], S. 171-188.
- Leister, D. (2005): Origin, evolution and genetic effects of nuclear insertions of organelle DNA. *Trends Genet* 21 [12], S. 655-663.
- Lerbs-Mache, S. (1993): The 110-kDa polypeptide of spinach plastid DNA-dependent RNA polymerase: single-subunit enzyme or catalytic core of multimeric enzyme complexes?. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 [12], S. 5509-5513.
- Lerbs, S.; Briat, J. F. und Mache, R. (1983): Chloroplast RNA polymerase from spinach: purification and DNA-binding proteins. *Plant Mol Biol* 2 [2], S. 67-74.
- Li, Z. S.; Szczypka, M.; Lu, Y. P.; Thiele, D. J. und Rea, P. A. (1996): The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J Biol Chem* 271 [11], S. 6509-6517.
- Liere, K. und Börner, T. (2007): Transcription and transcriptional regulation in plastids, In Bock, R., *Topics in Current Genetics: Cell and Molecular Biology of Plastids* 19, S. 121-174, Springer, Berlin / Heidelberg.
- Liere, K. und Link, G. (1994): Structure and expression characteristics of the chloroplast DNA region containing the split gene for tRNA(Gly) (UCC) from mustard (*Sinapis alba* L.). *Curr Genet* 26 [5-6], S. 557-563.
- Liere, K. und Maliga, P. (1999a): *In vitro* characterization of the tobacco *rpoB* promoter reveals a core sequence motif conserved between phage-type plastid and plant mitochondrial promoters. *EMBO Journal* 18 [1], S. 249-257.
- Liere, K. und Maliga, P. (1999b): Novel *in vitro* transcription assay indicates that the accD NEP promoter is contained in a 19 bp fragment. In Argyroudi-Akoyunoglou J. H., Senger H. (Hrsg.), *The chloroplast: from molecular biology to biotechnology*. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, S.79-84.
- Liere, K. und Maliga, P. (2001): Plastid RNA polymerases in higher plants, In Andersson, B. and Aro, E.-M., *Regulatory aspects of photosynthesis*, S. 29-49, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Liere, K.; Kaden, D.; Maliga, P. und Börner, T. (2004): Overexpression of phagetype RNA polymerase RpoTp in tobacco demonstrates its role in chloroplast transcription by recognizing a distinct promoter type. *Nucleic Acids Res* 32 [3], S. 1159-1165.
- Liere, K.; Weihe, A. und Börner, T. (2011): The transcription machineries of plant mitochondria and chloroplasts: Composition, function, and regulation. *J Plant Physiol* 168 [12], S. 1345-1360.
- Link, G. (1984): DNA sequence requirements for the accurate transcription of a protein-coding plastid gene in a plastid *in vitro* transcription system from mustard (*Sinapis alba* L.). *EMBO J* 3 [8], S. 1697-1704.
- Link, G. (1994). Plastid differentiation: organelle promoters and transcription factors. In Nover, L. (Hrsg.), *Plant Promoters and Transcription Factors - Results & Problems in Cell Differentiation* (S. 65-85). Berlin: Springer Verlag.

- Link, G. (1996): Green life: control of chloroplast gene transcription. *BioEssays* 18 [6], S. 465-471.
- Link, G. (2003): Redox regulation of chloroplast transcription. *Antioxid Redox Signal* 5 [1], S. 79-87.
- Little, M. C. und Hallick, R. B. (1988): Chloroplast *rpoA*, *rpoB*, and *rpoC* genes specify at least three components of a chloroplast DNA-dependent RNA polymerase active in tRNA and mRNA transcription. *J Biol Chem* 263 [28], S. 14302-14307.
- Liu, X.; Rodermel, S. R. und Yu, F. (2010): A var2 leaf variegation suppressor locus, SUPPRESSOR OF VARIEGATION3, encodes a putative chloroplast translation elongation factor that is important for chloroplast development in the cold. *BMC Plant Biol* 10 [287], S. 2-18.
- López-Juez, E. und Pyke, K. A. (2005): Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. *Int J Dev Biol* 49 [5-6], S. 557-577.
- Lurin, C.; Andres, C.; Aubourg, S.; Bellaoui, M.; Bitton, F.; Bruyere, C.; Caboche, M.; Debast, C.; Gualberto, J.; Hoffmann, B.; Lecharny, A.; Le Ret, M.; Martin-Magniette, M. L.; Mireau, H.; Peeters, N.; Renou, J. P.; Szurek, B.; Taconnat, L. und Small, I. (2004): Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* 16 [8], S. 2089-2103.
- Lysenko, E. (2007): Plant sigma factors and their role in plastid transcription. *Plant Cell Reports* 26 [7], S. 845-859.
- Madoka, Y.; Tomizawa, K.; Mizoi, J.; Nishida, I.; Nagano, Y. und Sasaki, Y. (2002): Chloroplast transformation with modified accD operon increases acetyl-CoA carboxylase and causes extension of leaf longevity and increase in seed yield in tobacco. *Plant Cell Physiol* 43 [12], S. 1518-1525.
- Maier, R. M. und Schmitz-Linneweber, C. (2004): Plastid genomes, In Daniell, H. and Chase, C. D., *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles*, S. 115-150, Springer, Dordrecht.
- Maliga, P. (1998): Two plastid polymerases of higher plants: an evolving story, *Trends Plant Sci* 3 [1], S. 4-6.
- Maliga, P. (2004): Plastid transformation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 55, S. 289-313.
- Maliga, P. und Bock, R. (2011): Plastid biotechnology: food, fuel, and medicine for the 21st century. *Plant Physiol* 155 [4], S. 1501-1510.
- Martin, W. (2003): Gene transfer from organelles to the nucleus: frequent and in big chunks, *PNAS* 100 [15], S. 8612-8614.
- Martin, W. und Herrmann, R. G. (1998): Gene transfer from organelles to the nucleus: How much, what happens, and why? *Plant Physiol* 118 [1], S. 9-17.
- Martin, W.; Rujan, T.; Richly, E.; Hansen, A.; Cornelsen, S.; Lins, T.; Leister, D.; Stoebe, B.; Hasegawa, M. und Penny, D. (2002): Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [19], S. 12246-51.
- Masters, B. S.; Stohl, L. L. und Clayton, D. A. (1987): Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7. *Cell* 51 [1], S. 89-99.
- Mathews, D. E. und Durbin, R. D. (1990): Tagetitoxin inhibits RNA synthesis directed by RNA polymerases from chloroplasts and Escherichia coli. *J Biol Chem* 265, S. 493-498.
- Matsunaga, M. und Jaehning, J. A. (2004): Intrinsic promoter recognition by a "core" RNA polymerase. *J Biol Chem* 279 [43], S. 44239-44242.
- McAllister, W. T. und Raskin, C. A. (1993): The phage RNA polymerases are related to DNA polymerases and reverse transcriptases. *Mol Microbiol* 10 [1], S. 1-6.
- McFadden, G. I. (2001): Chloroplast origin and integration. *Plant Physiol* 125 [1], S. 50-53.

- McCulloch, V.; Seidel-Rogol, L. und Shadel, G. S. (2002): A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine. *Mol Cell Biol* 22 [4], S. 1116-1125.
- Meng, B. Y.; Wakasugi, T. und Sugiura, M. (1991): Two promoters within the *psbK-psbI-trnG* gene cluster in tobacco chloroplast DNA. *Curr Genet* 20 [3], S. 259-264.
- Meurer, J.; Berger, A. und Westhoff, P. (1996): A nuclear mutant of *Arabidopsis* with impaired stability on distinct transcripts of the plastid *psbB*, *psbD/C*, *ndhH*, and *ndhC* operons. *Plant Cell* 8 [7], S. 1193-1207.
- Mielniczki-Pereira, A. A.; Schuch, A. Z.; Bonatto, D.; Cavalcante, C. F.; Vaitsman, D. S.; Riger, C. J.; Eleutherio, E. C. und Henriques, J. A. (2008): The role of the yeast ATP-binding cassette Ycf1p in glutathione and cadmium ion homeostasis during respiratory metabolism. *Toxicol Lett* 180 [1], S. 21-27.
- Millerd, A.; Goodchild, D. J. und Spencer, D. (1969): Studies on a Maize Mutant Sensitive to Low Temperature II. Chloroplast Structure, Development, and Physiology. *Plant Physiol* 44 [4], S. 567-583.
- Miyagi, T.; Kapoor, S.; Sugita, M. und Sugiura, M. (1998): Transcript analysis of the tobacco plastid operon *rps2/atpI/H/F/A* reveals the existence of a non-consensus type II (NCII) promoter upstream of the *atpI* coding sequence. *Mol Gen Genet* 257 [3], S. 299-307.
- Mogensen, H. L. (1996): The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. *Am J Bot* 83, S. 383-404.
- Moldavski, O.; Levin-Kravets, O.; Ziv, T.; Adam, Z. und Prag, G. (2012): The heterohexameric nature of a chloroplast AAA+ FtsH protease contributes to its thermodynamic stability. *PLoS One* 7 [4], e36008.
- Monde, R.A.; Schuster, G. und Stern, D.B. (2000): Processing and degradation of chloroplast mRNA. *Biochimie* 82 [6-7], S. 573-582.
- Mullet, J. E. (1993): Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Physiol* 103 [2], S. 309-313.
- Murashige, T. und Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15, S. 473-497.
- Murray, M. G. und Thompson, W. F. (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8 [19], S. 4321-4325.
- Nakamura, T.; Furuhashi, Y.; Hasegawa, K.; Hashimoto, H.; Watanabe, K.; Obokata, J.; Sugita, M. und Sugiura, M. (2003): Array-based analysis on tobacco plastid transcripts: Preparation of a genomic microarray containing all genes and all intergenic regions. *Plant Cell Physiol* 44 [8], S. 861-867.
- Nayak, D.; Guo, Q. und Sousa, R. (2009): A promoter recognition mechanism common to yeast mitochondrial and phage ϕ 7 RNA polymerases. *J Biol Chem*. 284 [20], S. 13641-13647.
- Neuhaus, H. und Link, G. (1990): The chloroplast *psbK* operon from mustard (*Sinapis alba* L.): multiple transcripts during seedling development and evidence for divergent overlapping transcription. *Curr Genet* 18 [4], pp. 377-383.
- Nickelsen, J. und Link, G. (1990): Nucleotide sequence of the mustard chloroplast genes *trnH* and *rps19'*. *Nucleic Acids Res* 18 [4], S. 1051.
- Nicol, J. W.; Helt, G. A.; Blanchard, S. G. Jr; Raja, A. und Loraine, A. E. (2009): The Integrated Genome Browser: free software for distribution and exploration of genome-scale datasets. *Bioinformatics* 25 [20], S. 2730-2731.
- Nishiyama, C.; Yokota, T.; Nishiyama, M.; Ra, C.; Okumura, K. und Ogawa, H. (2003): Molecular cloning of rat transcription factor YY1. *Biosci Biotechnol Biochem* 67 [3], S. 654-658.

- Ogrzewalla, K.; Piotrowski, M.; Reinbothe, S. und Link, G. (2002): The plastid transcription kinase from mustard (*Sinapis alba* L.). A nuclear-encoded CK2-type chloroplast enzyme with redoxsensitive function. *Eur J Biochem* 269 [13], S. 3329-3337.
- Oikawa, K.; Fujiwara, M.; Nakazato, E.; Tanaka, K. und Takahashi, H. (2000): Characterization of two plastid sigma factors, SigA1 and SigA2, that mainly function in matured chloroplasts in *Nicotiana tabacum*. *Gene* 261 [2], S. 221-228.
- Oldenburg, D. J. und Bendich, A. J. (2004): Most chloroplast DNA of maize seedlings in linear molecules with defined ends and branched forms. *J Mol Biol* 335 [4], S. 953-970.
- Orozco, E. M. Jr; Chen, L. J. und Eilers, R. J. (1990): The divergently transcribed *rbcl* and *atpB* genes of tobacco plastid DNA are separated by nineteen base pairs. *Curr Genet* 17 [1], S. 65-71.
- Palmer, J. D. (1991): Plastid chromosomes: structure and evolution. In Bogorad, L., Vasil, I.K. (Hrsg.), *Cell Culture and Somatic Genetics of Plants. Molecular Biology of Plastids* (S. 5-53). San Diego: Academic Press.
- Paratkar, S.; Deshpande, A. P.; Tang, G. Q. und Patel, S. S. (2011): The N-terminal domain of the yeast mitochondrial RNA polymerase regulates multiple steps of transcription. *J Biol Chem* 286 [18], S. 16109-16120.
- Parisi, M. A.; Xu, B. und Clayton, D. A. (1993): A human mitochondrial transcriptional activator can functionally replace a yeast mitochondrial HMG-box protein both in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol*. 13 [3], S. 1951-1961.
- Park, S.; Rancour, D. M. und Bednarek, S. Y. (2008): In planta analysis of the cell cycle-dependent localization of AtCDC48A and its critical roles in cell division, expansion, and differentiation. *Plant Physiol* 148 [1], S. 246-258.
- Pfalz, J.; Liere, K.; Kandlbinder, A.; Dietz, K.-J. und Oelmüller, R. (2006): pTAC2, -6 and -12 are components of the transcriptionally active plastid chromosome that are required for plastid gene expression. *Plant Cell* 18 [1], S. 176-197.
- Pfannschmidt, T. und Liere, K. (2005): Redox regulation and modification of proteins controlling chloroplast gene expression. *Antioxid Redox Signal* 7 [5-6], S. 607-618.
- Pfannschmidt, T. und Link, G. (1994): Separation of two classes of plastid DNA-dependent RNA polymerases that are differentially expressed in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Plant Mol Biol* 25 [1], S. 69-81.
- Pfannschmidt, T. und Link, G. (1997): The A and B forms of plastid DNA-dependent RNA polymerase from mustard (*Sinapis alba* L.) transcribe the same genes in a different developmental context. *Mol Gen Genet* 257 [1], S. 35-44.
- Pfannschmidt, T.; Ogrzewalla, K.; Baginsky, S.; Sickmann, A.; Meyer, H. E. und Link, G. (2000): The multisubunit chloroplast RNA polymerase A from mustard (*Sinapis alba* L.): Integration of a prokaryotic core into a larger complex with organellespecific functions. *Eur J Biochem* 267 [1], S. 253-261.
- Privat, I.; Hakimi, M. A.; Buhot, L.; Favory, J. J. und Lerbs.Mache, S. (2003): Characterization of Arabidopsis plastid sigma-like transcription factors SIG1, SIG2 and SIG3. *Plant Mol Biol* 51 [3], S. 385-399.
- Purton, S. und Gray, J. C. (1989): The plastid *rpoA* gene encoding a protein homologous to the bacterial RNA polymerase alpha subunit is expressed in pea chloroplasts. *Mol Gen Genet* 217 [1], S. 77-84.
- Qi, Y.; Armbruster, U.; Schmitz-Linneweber, C.; Delannoy, E.; de Longevialle, A. F.; Rühle, T.; Small, I.; Jahns, P. und Leister, D. (2012): Arabidopsis CSP41 proteins form multimeric complexes that bind and stabilize distinct plastid transcripts. *J Exp Bot* 63 [3], S. 1251-1270.

- Raab, S.; Toth, Z.; de Groot, C.; Stamminger, T. und Hoth, S. (2006): ABA-responsive RNA-binding proteins are involved in chloroplast and stromule function in *Arabidopsis* seedlings. *Planta* 224 [4], S. 900-914.
- Rantanen, A.; Gaspari, M.; Falkenberg, M.; Gustafsson, C. M. und Larsson, N. G. (2003): Characterization of the mouse genes for mitochondrial transcription factors B1 and B2. *Mamm Genome* 14 [1], S. 1-6.
- Rapp, J. C.; Baumgartner, B. J. und Mullet, J. (1992): Quantitative analysis of transcription and RNA levels of 15 barley chloroplast genes. Transcription rates and mRNA levels vary over 300-fold; predicted mRNA stabilities vary 30-fold. *J Biol Chem* 267 [30], S. 21404-21411.
- Reboud, X. und Zeyl, C. (1994): Organelle inheritance in plants. *Heredity* 72, S. 132–140.
- Richly, E. und Leister, D. (2004): An improved prediction of chloroplast proteins reveals diversities and commonalities in the chloroplast proteomes of *Arabidopsis* and rice. *Gene* 329, S. 11-16.
- Richter, U.; Kiessling, J.; Hedtke, B.; Decker, E.; Reski, R.; Börner, T. und Weihe, A. (2002): Two RpoT genes of *Physcomitrella patens* encode phage-type RNA polymerases with dual targeting to mitochondria and plastids. *Gene* 290 [1-2], S. 95-105.
- Richter U.; Kühn K.; Okada S.; Brennicke A.; Weihe A. und Börner T. (2010): A mitochondrial rRNA dimethyladenosine methyltransferase in *Arabidopsis*. *Plant J* 61 [4], S. 558–569.
- Rozen, S. und Skaletsky, H. J. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132, S. 365-386.
- Ruf, S.; Hermann, M.; Berger, I. J.; Carrer, H. und Bock R. (2001): Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat Biotechnol* 19 [9], S. 870-875.
- Ruf, S.; Karcher, D. und Bock, R. (2007): Determining the transgene containment level provided by chloroplast transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 [17], S. 6998-7002.
- Sakai, A.; Saito, C.; Inada, N. und Kuroiwa, T. (1998): Transcriptional activities of the chloroplast-nuclei and proplastid-nuclei isolated from tobacco exhibit different sensitivities to tagetitoxin: implication of the presence of distinct RNA polymerases. *Plant Cell Physiol* 39 [9], pp. 928-934.
- Sambrook, J. and Russell, D. (2001): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Saraste, M. (1999): Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283 [5407], pp. 1488-1493.
- Sato, N. (2001): Was the evolution of plastid genetic machinery discontinuous? *Trends Plant Sci* 6 [5], pp. 151–5.
- Sato, N.; Terasawa, K.; Miyajima, K. and Kabeya, Y. (2003): Organization, developmental dynamics, and evolution of plastid nucleoids. *Int Rev Cytol* 232, pp. 217-262.
- Sato, S.; Nakamura, Y.; Kaneko, T.; Asamizu, E. and Tabata, S. (1999): Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research* 6 [5], pp. 283-290.
- Satoh, J.; Baba, K.; Nakahira, Y.; Shiina, T. und Toyoshima, Y. (1997): Characterization of dynamics of the psbD light-induced transcription in mature wheat chloroplasts. *Plant Mol Biol* 33 [2], S. 267-78.
- Satoh, J.; Baba, K.; Nakahira, Y.; Tsunoyama, Y.; Shiina, T. und Toyoshima, Y. (1999): Developmental stage-specific multi-subunit plastid RNA polymerases (PEP) in wheat. *Plant Journal* 18 [4], pp. 407-416.

- Schinkel, A. H.; Koerkamp, M. J.; Touw, E. P. und Tabak, H. F. (1987): Specificity factor of yeast mitochondrial RNA polymerase. Purification and interaction with core RNA polymerase. *J Biol Chem* 262 [26], S. 12785-12791.
- Schmidt, T. G. und Skerra, A. (2007): The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc* 2 [6], S. 1528-1535.
- Schmitz-Linneweber, C.; Williams-Carrier, R. und Barkan, A. (2005): RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast Pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5' region of mRNAs whose translation it activates. *Plant Cell* 17 [10], S. 2791-2804.
- Schmitz-Linneweber, C. und Barkan, A. (2007): RNA splicing and RNA editing in chloroplasts. *Topics in Current Genetics* 19, S. 213-248, Springer, Berlin/Heidelberg.
- Schrubar, H.; Wanner, G. und Westhoff, P. (1990): Transcriptional control of plastid gene expression in greening *sorghum* seedlings. *Planta* 183 [1], S. 101-111.
- Schuster, G.; Lisitsky, I. und Klaff, P. (1999): Polyadenylation and degradation of mRNA in the chloroplast. *Plant Physiol* 120 [4], S. 937-944.
- Schweer, J. (2010): Plant sigma factors come of age: flexible transcription factor network for regulated plastid gene expression. *Endocytobio Cell Res* 20, S. 1-20.
- Schweer, J.; Türkeri, H.; Kolpack, A. und Link, G. (2010): Role and regulation of plastid sigma factors and their functional interactors during chloroplast transcription – recent lessons from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Cell Biol* 89 [12], S. 940–6.
- Serino, G. und Maliga, P. (1998): RNA polymerase subunits encoded by the plastid *rpo* genes are not shared with the nucleus-encoded plastid enzyme. *Plant Physiol* 117 [4], S. 1165-1170.
- Sexton, T. Berends; Christopher, D. A. und Mullet, J. E. (1990): Light-induced switch in barley *psbD-psbC* promoter utilization: a novel mechanism regulating chloroplast gene expression. *EMBO J* 9 [13], S. 4485-4494.
- Shaw, K. J.; Rather, P. N.; Hare, R. S. und Miller, G.H. (1993): Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 57 [1], S. 138-163.
- Shevchenko, A.; Tomas, H.; Havlis, J.; Olsen, J. V. und Mann, M. (2006): In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc.* 1 [6], S. 2856-2860.
- Shiina, T.; Allison, L. und Maliga, P. (1998): *rbcL* transcript levels in tobacco plastids are independent of light: reduced dark transcription rate is compensated by increased mRNA stability. *Plant Cell* 10 [10], S. 1713-1722.
- Shiina, T.; Tsunoyama, Y.; Nakahira, Y. und Khan, M. S. (2005): Plastid RNA polymerases, promoters, and transcription regulators in higher plants. *Int Rev Cytol* 244, S. 1-68.
- Shikanai, T.; Shimizu, K.; Ueda, K.; Nishimura, Y.; Kuroiwa, T. und Hashimoto, T. (2001): The chloroplast *clpP* gene, encoding a proteolytic subunit of ATP-dependent protease, is indispensable for chloroplast development in tobacco. *Plant Cell Physiol* 42 [3], S. 264-273.
- Shinozaki, K.; Ohme, M.; Tanaka, M.; Wakasugi, T.; Hayashida, N.; Matsabayashi, T.; Zaita, N.; Chungwongse, J.; Obokata, J.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Deno, H.; Kamogashira, T.; Yamada, K.; Kasuda, J.; Takaiwa, F.; Kato, A.; Todoh, N.; Shimada, H. und Sugiura, M. (1986): The complete sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J* 5 [9], S. 2043-2049.
- Siemenroth, A.; Wollgiehn, R.; Neumann, D. und Börner, T. (1981): Synthesis of ribosomal RNA in ribosome-deficient plastids of the mutant *albostrians* of *Hordeum vulgare* L. *Planta* 153 [6], S. 547-555.
- Silhavy, D. und Maliga, P. (1998): Mapping of promoters for the nucleus-encoded plastid RNA polymerase (NEP) in the *iojap* maize mutant. *Curr Genet* 33 [5], S. 340-344.

- Sriraman, P.; Silhavy, D. und Maliga, P. (1998a): The phage-type *PclpP-53* plastid promotor comprises sequences downstream of the transcription initiation site. *Nucleic Acids Res* 26 [21], S. 4874-4879.
- Sriraman, P.; Silhavy, D. und Maliga, P. (1998b): Transcription from heterologous rRNA operon promoters in chloroplasts reveals requirement for specific activating factors. *Plant Physiol* 117 [4], S. 1495-1499.
- Staub, J. M. und Maliga P. (1992): Long regions of homologous DNA are incorporated into the tobacco plastid genome by transformation. *Plant Cell* 4 [1], S. 39-45.
- Staub, J. M. und Maliga, P. (1993): Accumulation of D1 polypeptide in tobacco plastids is regulated via the untranslated region of the *psbA* mRNA. *EMBO J* 12 [2], S. 601-606.
- Stefanović, S. und Olmstead, R. G. (2005): Down the slippery slope: plastid genome evolution in Convolvulaceae. *J Mol Evol* 61 [3], S. 292-305.
- Steiner, S.; Schröter, Y.; Pfalz, J. und Pfannschmidt, T. (2011): Identification of essential subunits in the plastid-encoded RNA polymerase complex reveals building blocks for proper plastid development. *Plant Physiol* 157 [3], S. 1043-1055.
- Stern, D. B.; Goldschmidt-Clermont, M. und Hanson M. R. (2010): Chloroplast RNA metabolism. *Annu Rev Plant Biol* 61, S 125–155.
- Suck, R.; Zeltz, P.; Falk, J.; Acker, A.; Kössel, H. und Krupinska, K. (1996): Transcriptionally active chromosomes (TACs) of barley chloroplasts contain the α -subunit of plastome encoded RNA polymerase. *Current Genetics* 30 [6], S. 515-521.
- Sugita, M. und Sugiura, M. (1996): Regulation of gene expression In chloroplasts of higher plants. *Plant Mol Biol* 32 [1-2], S. 315-326.
- Sugiura, M. (1992): The chloroplast genome. *Plant Mol Biol* 19 [1], S. 149-168
- Sugiura, M. (1995): The chloroplast genome. *Essays Biochem* 30, S. 49-57.
- Sun, E.; Wu, B. W. und Tewari, K. K. (1989): In vitro analysis of the pea chloroplast 16S rRNA gene promoter. *Mol Cell Biol* 9 [12], S. 5650-5659.
- Surzycki, S.J. und Shellenbarger, D.L. (1976): Purification and characterization of a putative sigma factor from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73 [11], S. 3961-3965.
- Suzuki, J. Y.; Sriraman, P.; Svab, Z. und Maliga, P. (2003): Unique architecture of the plastid ribosomal RNA operon promoter recognized by the multisubunit RNA polymerase in tobacco and other higher plants. *Plant Cell* 15 [1], S. 195-205.
- Svab, Z.; Hajdukiewicz, P. und Maliga, P. (1990a): Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 [21], S. 8526-8530.
- Svab, Z.; Harper, E. C.; Jones, J. D. und Maliga, P. (1990b): Aminoglycoside-300-adenyltransferase confers resistance to spectinomycin and streptomycin in *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol* 14 [2], S. 197–205.
- Svab, Z. und Maliga, P. (1993): High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, S. 913-917.
- Svab, Z. und Maliga, P. (2007): Exceptional transmission of plastids and mitochondria from the transplastomic pollen parent and its impact on transgene containment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 [17], S. 7003-7008.
- Swiatecka-Hagenbruch, M.; Emanuel, C.; Hedtke, B.; Liere, K. und Börner, T. (2008): Impaired function of the phage-type RNA polymerase RpoTp in transcription of chloroplast genes is compensated by a second phage-type RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 36 [3], S. 785-792.
- Swiatecka-Hagenbruch, M.; Liere, K. und Börner, T. (2007): High diversity of plastidial promoters in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* 277 [6], S. 725-734.
- Swiatecka, M. (2003): Organelläre phagenähnliche RNA-Polymerasen:Transkriptanalyse RpoT-überexprimierender Arabidopsispflanzen, Humboldt-Universität, Berlin.

- Tanaka, K.; Tozawa, Y.; Mochizuki, N.; Shinozaki, K.; Nagatani, A.; Wakasa, K. und Takahashi, H. (1997): Characterization of three cDNA species encoding plastid RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis thaliana*: evidence for the sigma factor heterogeneity in higher plant plastids. *FEBS Letters* 413 [2], S. 309-313.
- Tang, G. Q.; Paratkar, S. und Patel, S. S. (2009): Fluorescence mapping of the open complex of yeast mitochondrial RNA polymerase. *J Biol Chem* 284 [9], S. 5514-22.
- Tehseen, M.; Cairns, N.; Sherson, S. und Cobbett, C. S. (2010): Metallochaperone-like genes in *Arabidopsis thaliana*. *Metallomics* 2 [8], S. 556-564.
- Thelen, J. J. und Ohlrogge, J. B. (2002): The multisubunit acetyl-CoA carboxylase is strongly associated with the chloroplast envelope through non-ionic interactions to the carboxyltransferase subunits. *Arch Biochem Biophys* 400 [2], S. 245-257.
- Thum, K. E.; Kim, M.; Morishige, D. T.; Eibl, C.; Koop, H.-U. und Mullet, J. E. (2001): Analysis of barley chloroplast *psbD* light-responsive promoter elements in transplastomic tobacco. *Plant Mol Biol* 47 [3], S. 353-366.
- Thyssen, G.; Svab, Z.; und Maliga, P. (2012): Exceptional inheritance of plastids via pollen in *Nicotiana glauca* with no detectable paternal mitochondrial DNA in the progeny. *Plant J* 72 [1], S. 84-88.
- Tiller, K. und Link, G. (1993): Phosphorylation and dephosphorylation affect functional characteristics of chloroplast and etioplast transcription systems from mustard (*Sinapis alba* L.). *EMBO J* 12 [5], S. 1745-1753.
- Tillich, M.; Lehwark, P.; Morton, B. R. und Maier, U. G. (2006): The evolution of chloroplast RNA editing. *Mol Biol Evol* 23 [10], S. 1912-1921.
- Timmis, J. N.; Ayliffe, M. A.; Huang, C. Y. und Martin, W. (2004): Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet* 5 [2], S. 123-135.
- Tiranti, V.; Savoia, A.; Forti, F.; D'Apolito, M. F.; Centra, M.; Rocchi, M. und Zeviani, M. (1997): Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPO) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database. *Hum Mol Genet* 6 [4], S. 615-625.
- Tokuhi, J. G.; Vijayan, P.; Feldmann, K. A. und Browse, J. A. (1998): Chloroplast development at low temperatures requires a homolog of DIM1, a yeast gene encoding the 18S rRNA dimethylase. *Plant Cell* 10 [5], S. 699-712.
- Tracy, R. L. und Stern, D. B. (1995): Mitochondrial transcription initiation: promoter structures and RNA polymerases, *Current Genetics* 28 [3], S. 205-216.
- Troxler, R. F.; Zhang, F.; Hu, J. und Bogorad, L. (1994): Evidence that sigma factors are components of chloroplast RNA polymerase. *Plant Physiol* 104 [2], S. 753-759.
- Udvardi, M. K.; Czechowski, T. und Scheible, W. R. (2008): Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell* 20 [7], S. 1736-1737.
- Vera, A.; Hirose, T. und Sugiura, M. (1996): A ribosomal protein gene (*rpl32*) from tobacco chloroplast DNA is transcribed from alternative promoters - similarities in promoter region organization in plastid housekeeping genes. *Mol Gen Genet* 251 [5], S. 518-525.
- Vera, A. und Sugiura, M. (1995): Chloroplast rRNA transcription from structurally different tandem promoters: an additional novel-type promoter. *Curr Genet* 27 [3], S. 280-284.
- Vera, A.; Yokoi, F. und Sugiura, M. (1993): The existence of pre-mature 16S rRNA species in plastid ribosomes. *FEBS Lett* 327 [1], S. 29-31.
- Voelker, R. und Barkan, A. (1995): Two nuclear mutations disrupt distinct pathways for targeting proteins to the chloroplast thylakoid. *EMBO J* 14 [16], S. 3905-3914.
- Wagner, R.; Aigner, H. und Funk, C. (2012): FtsH proteases located in the plant chloroplast. *Physiol Plant* 145 [1], S. 203-14.

- Wakasugi, T.; Tsudzuki, T. und Sugiura, M. (2001): The genomics of land plant chloroplasts: Gene content and alteration of genomic information by RNA editing. *Photosynthesis Res* 70 [1], S. 107-118.
- Wang, T. und Wu, M. (2006): An ATP-binding cassette transporter related to yeast vacuolar ScYCF1 is important for Cd sequestration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Environ* 29 [10], S. 1901-1912.
- Weihe, A. (2004): The transcription of plant organelle genomes. In Daniell, H. and Chase, C. D., *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles*, S. 213-237, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Werhahn, W.; Niemeyer, A.; Jansch, L.; Kruft, V.; Schmitz, U. K. und Braun, H. (2001): Purification and characterization of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from *Arabidopsis*. Identification of multiple forms of TOM20. *Plant Physiol* 125 [2], S. 943-954.
- Wilson, I. A.; Niman, H. L.; Houghten, R. A.; Cherenson, A. R.; Connolly, M.L. und Lerner, R.A. (1984): The structure of an antigenic determinant in a protein. *Cell* 37 [3], S.767-778.
- Wolfe, K. H. (1994): Similarity between putative ATP-binding sites in land plant plastid ORF2280 proteins and the FtsH/CDC48 family of ATPases. *Curr Genet* 25 [4], S. 379-383.
- Wolfe, K. H. und Sharp, P. M. (1988): Identification of functional open reading frames in chloroplast genomes. *Gene* 66 [2], S. 215-22.
- Wu, C. Y.; Lin, C. H. und Chen, L. J. (1997): Identification of the transcription start site for the spinach chloroplast serine tRNA gene. *FEBS Letters* 418 [1-2], S.157-161.
- Wurbs, D.; Ruf, S. und Bock R. (2007): Contained metabolic engineering in tomatoes by expression of carotenoid biosynthesis genes from the plastid genome. *Plant J* 49 [2], S. 276-88.
- Xie, G. und Allison, L. A. (2002): Sequences upstream of the YRTA core region are essential for transcription of the tobacco *atpB* NEP promoter in chloroplasts *in vivo*. *Curr Genet* 41 [3], S. 176-182.
- Xu, B. und Clayton, D. A. (1992): Assignment of a yeast protein necessary for mitochondrial transcription initiation. *Nucleic Acids Res* 20 [5], S. 1053-1059.
- Yagi, Y.; Ishizaki, Y.; Nakahira, Y.; Tozawa, Y. und Shiina, T. (2012): Eukaryotic-type plastid nucleoid protein pTAC3 is essential for transcription by the bacterial-type plastid RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 [19], S. 7541-6.
- Yang, D.; Oyaizu, Y.; Oyaizu, H.; Olsen, G. J. und Woese, C. R. (1985): Mitochondrial origins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 [13], S. 4443-4447.
- Yang, Z. X.; Zhou, Y. N.; Yang, Y. und Jin, D. J. (2010): Polyphosphate binds to the principal sigma factor of RNA polymerase during starvation response in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 77 [3], S. 618-627.
- Yao, J.; Roy-Chowdhury, S. und Allison, L. A. (2003): AtSig5 is an essential nucleus-encoded *Arabidopsis* σ -like factor. *Plant Physiol* 132 [2], S. 739-747.
- Yin C.; Richter U.; Börner T. und Weihe A. (2010): Evolution of plant phage-type RNA polymerases: the genome of the basal angiosperm *Nuphar advena* encodes two mitochondrial and one plastid phage-type RNA polymerases. *BMC Evol Biol* 10, S. 379.
- Zhang, Q. und Sodmergen. (2010): Why does biparental plastid inheritance revive in angiosperms? *J Plant Res* 123 [2], S. 201-206.
- Zhang, X.; Henriques, R.; Lin, S. S.; Niu, Q. W. und Chua, N. H. (2006): *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat Protoc* 1 [2], S. 641-646.

- Zhelyazkova, P.; Hammani, K.; Rojas, M.; Voelker, R.; Vargas-Suárez, M.; Börner, T. und Barkan, A. (2012a): Protein-mediated protection as the predominant mechanism for defining processed mRNA termini in land plant chloroplasts. *Nucleic Acids Res* 40 [7], S. 3092-3105.
- Zhelyazkova, P.; Sharma, C. M.; Förstner, K. U.; Liere, K.; Vogel, J. und Börner, T. (2012b): The primary transcriptome of barley chloroplasts: numerous noncoding RNAs and the dominating role of the plastid-encoded RNA polymerase. *Plant Cell* 24 [1], S. 123-36.
- Zhou, D. X.; Massenet, O.; Quigley, F.; Marion, M. J.; Monéger, F.; Huber, P. und Mache, R. (1988): Characterization of a large inversion in the spinach chloroplast genome relative to *Marchantia*: a possible transposon-mediated origin. *Curr Genet* 13 [5], S. 433-439.
- Zoschke, R.; Liere, K. und Börner, T. (2007): From seedling to mature plant: *Arabidopsis* plastidial genome copy number, RNA accumulation and transcription are differentially regulated during leaf development. *Plant J* 50 [4], S. 710-722.
- Zoschke, R.; Nakamura, M.; Liere, K.; Sugiura, M.; Börner, T. und Schmitz-Linneweber, C. (2010): An organellar maturase associates with multiple group II introns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 107 [7], S. 3245-3250.
- Zoubenko, O. V.; Allison, L. A.; Svab, Z. und Maliga, P. (1994): Efficient targeting of foreign genes into the tobacco plastid genome. *Nucleic Acids Res* 22 [19], S. 3819-3824.

Anhang

Tab. A1: Verwendete Oligonukleotide. *A. t.* = *Arabidopsis thaliana*, *N. t.* = *Nicotiana tabacum*, Genotyp. = Genotypisierung, Klon. = Klonierung, rG = rechte Rekombinationsgrenze, lG = linke Rekombinationsgrenze, Sequ. = Sequenzierung, het. Expr. = heterologe Expression

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Ziel	Verwendung
AtFLAG-HA-RpoT_fw	CTAGTGATTACAAGGATGACGATGACAAG CCGCGGTACCCATATGATGTTCCAGATTA CGCTC		FLAG-HA-Epitopsequenz für transgene <i>A. t.</i>
AtFLAG-HA-RpoT_rev	CCGGGAGCGTAATCTGGAACATCATATGG GTACCGCGGCTTGTCATCGTCATCCTTGTA ATCA		FLAG-HA-Epitopsequenz für transgene <i>A. t.</i>
At3xFLAG-RpoT_fw	CTAGTGATTACAAGGATGACGATGACAAG CCGCGGGATTACAAGGATGACGATGACAA GGATTACAAGGATGACGATGACAAGC		3xFLAG-Epitopsequenz für transgene <i>A. t.</i>
At3xFLAG-RpoT_rev	CCGGGCTTGTCATCGTCATCCTTGTAATCC TTGTCATCGTCATCCTTGTAATCCCCGCGC TTGTCATCGTCATCCTTGTAATCA		3xFLAG-Epitopsequenz für transgene <i>A. t.</i>
At3xHA-RpoT_fw	CTAGTTACCCATATGATGTTCCAGATTACG CTCCGCGGTACCCATATGATGTTCCAGATT ACGCTTACCCATATGATGTTCCAGATTAC GCTC		3xHA-Epitopsequenz für transgene <i>A. t.</i>
At3xHA-RpoT_rev	CCGGGAGCGTAATCTGGAACATCATATGG GTAAGCGTAATCTGGAACATCATATGGGT ACCGCGGAGCGTAATCTGGAACATCATAT GGGTAA		3xHA-Epitopsequenz für transgene <i>A. t.</i>
K-FLAGSacII	GATGACGATGACAAGCCGCG	FLAG-tag	Genotyp.
K-HA	CCCATATGATGTTCCAGATTACGC	HA-tag	Genotyp.
K-AtTp-fw	CCTTAAACCCAAACCTCTCATTTCC	<i>A. t.</i>	Genotyp.
K-AtTp-rev-s	GCAGGCCAAAAGCTCAATATGAGG	<i>A. t.</i>	Genotyp.
K-AtTmp-fw	CCACTGTTCTTGCGCAAATCAGAC	<i>A. t.</i>	Genotyp.
K-AtTmp-rev-s	GGTAATGTGCATAAGTTGCTTTGC	<i>A. t.</i>	Genotyp.
K-AtTm-fw	GGAGGAACATTCTGGGAAGAGC	<i>A. t.</i>	Genotyp.
K-AtTm-rev-s	CGCATACGGAATCTTCCCTTTC	<i>A. t.</i>	Genotyp.
K-AtRpoT-rev-l	GCTCGAGACCGGTTTCAGTTG	<i>A. t.</i>	Genotyp.
tpNt01	CGAGCCCGGGTTCCCGATCTAC	<i>aadA</i>	Aus pPRV111A
tpNt02	CGAGCTGCAGTTCCCGATCTAC	<i>aadA</i>	Aus pPRV111A
tpNt03	ATAACGGCCGAAATCGGATTC	<i>aadA</i>	Aus pPRV111A
tpNt01b	CTAGCCCGGGAAAGCTCCCC	<i>aadA</i>	Aus pRB94
tpNt02b	CACTGCAGGTCGTTTTACAAGTAGC	<i>aadA</i>	Aus pRB94
tpNt03b	TACTCGGCCGTGAATAAATGCAAG	<i>aadA</i>	Aus pRB94
tpNtPatpB_fw	GAAAAACACAAAGAAAAGAATAGG	<i>N. t. PatpB</i>	Klon. PatpB
tpNtPatpB_rev	GAATCAGAATCTTGAGAAAGTC	<i>N. t. PatpB</i>	Klon. PatpB
tpNt04	ATAACCCGGGATGCTGAAATTG	<i>N. t. PatpB</i>	Klon. PatpB
tpNt05-PatpBvfw2	GCATAAATCGATCTGCAGAAAT	<i>N. t. PatpB</i>	Klon. PatpB
tpNt06-PatpBvrev	CTATTCTATGGAATTGCAACC	<i>N. t. PatpB</i>	Klon. PatpB
tpNt07b	CAGAAGCTTGAGAAAGTCTTTC	<i>N. t. PatpB</i>	Klon. PatpB
tpNt08b	TCTTGGGCCCCGTCTTTCATTTG	<i>N. t. PatpB</i>	Klon. PatpB
tpNt09	TCGAATTCGTATGAATAGATAAT	<i>N. t. PatpB</i>	Klon. PatpB
tpNt10	ATTACCCGGGATTTTACGAAAC	<i>N. t. PaccD</i>	Klon. PaccD
tpNt12	GAAAGCTTCACGCGCTATTAATATG	<i>N. t. PaccD</i>	Klon. PaccD NEP-
tpNt13	GTGAAGCTTTCCCCCAGATTC	<i>N. t. PaccD</i>	Klon. accD rG
tpNt14	ATTGGGCCCAAAATGCCTG	<i>N. t. accD</i>	Klon. accD rG
tpNt15	GGTAGAGCTCTTTATGAATGTC	<i>N. t.</i>	Klon. accD lG
tpNt16	ATCTCGGCCGATACTAATATCTA	<i>N. t.</i>	Klon. accD lG
tpNt35-accDrbfw	TTCAAAGCTTTTTTTTCAATACTCACAATCC	<i>N. t. PaccD</i>	Klon. accD rG
tpNt18b	AAATGGGCCCATTTTTGTTTTGATATTC	<i>N. t. rpoB</i>	Klon. rpoB rG
tpNt19b	TAGAGGTACCTTTCCGATAAAAAATTG	<i>N. t. rpoB</i>	Klon. rpoB rG
tpNt22-rpoBlbfw	CTTGATAGCCCCTCGAGCTCTCGA	<i>N. t.</i>	Klon. rpoB lG

tpNt23- <i>rpoB</i> lrev	GGTTTTTTAGCATTTAACGGCCGTTTC	<i>N. t.</i>	Klon. <i>rpoB</i> IG
tpNt26-K <i>rpoB</i> fw	GTAACTGCAGAAAAACCGATTC	<i>N. t. PrpoB</i>	Klon. <i>rpoB</i> rG
tpNt27- <i>rrn16</i> Δfw	TAAGCCCCGGGTGAGTTTTTCTAG	<i>N. t. Prn16</i>	Klon. <i>Prn16</i>
tpNt28b	CGTCAAGCTTACGAGCCTC	<i>N. t. Prn16</i>	Klon. <i>Prn16</i> PEP-
tpNt29b	TATAAAGCTTGGAGCGAACTCC	<i>N. t. Prn16</i>	Klon. <i>rrn16</i> rG
tpNt30- <i>rrn16</i> lrev	GGTCGGTACCCACAGCGCCTAG	<i>N. t. rrn16</i>	Klon. <i>rrn16</i> rG
tpNt31- <i>rrn16</i> lbfw	TCGATGAGCTCTGTTGAAGGG	<i>N. t.</i>	Klon. <i>rrn16</i> IG
tpNt32- <i>rrn16</i> lrev	CACATCGGCCGTAGGGATAATC	<i>N. t.</i>	Klon. <i>rrn16</i> IG
tpNt33- <i>rrn16</i> rev	CTTGAATTTCGCGGCATAAATTG	<i>N. t. Prn16</i>	Klon. <i>Prn16</i> NEP-
tpNt34- <i>rrn16</i> rbfw	CCTTGGAATTCAAGACAATTC	<i>N. t. Prn16</i>	Klon. <i>rrn16</i> rG
tpNt-43	AATATGAGCTCCAGCTACACCTTCG	<i>N. t.</i>	Klon. <i>clpP1</i> IG
tpNt-44	AAAACGGCCGCAACTCCCC	<i>N. t.</i>	Klon. <i>clpP1</i> IG
tpNt-45	GTTGCTGCAGTTTTCTATGAGCG	<i>N. t. PclpP1</i>	Klon. <i>PclpP1</i>
tpNt-46	GTAGATCAATATTCATATTGGTTTTTATCG	<i>N. t. PclpP1</i>	Klon. <i>PclpP1</i>
tpNt-47	GAATATTGATCTACATACACCTTGTTG	<i>N. t. PpsbA</i>	Klon. <i>PpsbA</i>
tpNt-48	AGGCATGGTAAAACTTGGTTTATTTAATC	<i>N. t. PpsbA</i>	Klon. <i>PpsbA</i>
tpNt-49	TTTACCATGCCTATTGGTGTTCCAAAG	<i>N. t. clpP1</i>	Klon. <i>clpP1</i> rG
tpNt-50	TCAAGGTACCGATTCCAGTCCTC	<i>N. t. clpP1</i>	Klon. <i>clpP1</i> rG
tpNt-51	TGTCATTTTCGAGGTTGAAGTGTGACACTTT	<i>N. t. PclpP1</i>	Klon. <i>PclpP1</i> NEP-
	TTTTTATTGTCTTTATAATATTC		
tpNt-52	AGTGTCACTTCAACCTCGAAATGACAT	<i>N. t. PclpP1</i>	Klon. <i>PclpP1</i> NEP-
	ATAGTATTTAGTTCTTTCTTTC		
tpNt-53	TACTGCAGAATCTAAACTAAAATAATC	<i>N. t.</i>	Klon. <i>PtrnE</i>
tpNt-54	TAGAATTAATTCATTAGAACGCCAT	<i>N. t.</i>	Klon. <i>PtrnE</i>
tpNt-55	TAATGAATTAATTCTATATATTCTTTC	<i>N. t. PrpoB</i>	Klon. <i>PrpoB</i>
tpNt-56	CCGCCATCTCTACCATTATTATG	<i>N. t. PrpoB</i>	Klon. <i>PrpoB</i>
tpNt-57	ATGGTAGAGATGGCGGTTGG	<i>N. t. trnE</i>	Klon. <i>trnE</i> rG
tpNt-58	GAGGTACCTTTGCTTTGAC	<i>N. t. trnE</i>	Klon. <i>trnE</i> rG
tpNt-59	ACGAGCTCGAATTGCTTTTTTTC	<i>N. t.</i>	Klon. <i>trnE</i> IG
tpNt-60	TTCGGCCGTATTTAGAATTTTC	<i>N. t.</i>	Klon. <i>trnE</i> IG
tpNt-63	CTATGATCTATAATCGAATGATTC	<i>N. t. PtrnE</i>	Klon. <i>PtrnE</i> PEP-
tpNt-64	CGATTATAGATCATAGTATGATGG	<i>N. t. PtrnE</i>	Klon. <i>PtrnE</i> PEP-
K-tpNt- <i>accD</i> -fw	GAATTGCAATTAAACTCGGCCC	<i>N. t.</i>	Genotyp.
K-tpNt- <i>accD</i> -rev	AAGCATAGAAATCCAATCACTAGG	<i>N. t. accD</i>	Genotyp.
K-tpNt- <i>accD</i> -rev2	CAA TTG CTA CGG GAA TGC CG	<i>N. t. accD</i>	Genotyp.
K-tpNt- <i>rpoB</i> -fw	GTAACCCCCCAAGAGAAATTG	<i>N. t.</i>	Genotyp.
K-tpNt- <i>rpoB</i> -rev	CCACTATTGGTTCATTCTTCATC	<i>N. t. rpoB</i>	Genotyp.
K-tpNt- <i>rpoB</i> -rev2	CTA ATT CTG ATC TTC CTC CCC	<i>N. t. rpoB</i>	Genotyp.
K-tpNt- <i>rrn16</i> -fw	CAGTTCTATTTCTCGATGGGG	<i>N. t.</i>	Genotyp.
K-tpNt- <i>rrn16</i> -rev	TTGGTAAGCTATTGCCTCACC	<i>N. t. rrn16</i>	Genotyp.
pZ59 <i>aadA</i> for	ACTCTTTGATCCGGTTCTTG	<i>aadA</i>	Genotyp.
78-3'SH3748	AGACATTATTTGCCGACTACCTTG	<i>aadA</i>	Genotyp., Sequ.
103-3' <i>aadA</i>	CGATGACGCCAACTACCTC	<i>aadA</i>	Genotyp., Sequ.
106-5' <i>aadA</i> m	GCCTCGCGCGCAG	<i>aadA</i>	Genotyp., Sequ.
Sequ- <i>accD</i> lb	CAAATCTTGTATATCTAGG	<i>N. t.</i>	Sequ.
Sequ- <i>accD</i> lb2	CGGAAGTGGATACCATG	<i>N. t.</i>	Sequ.
Seq <i>PaccD</i>	AAT ATA AAG GGG GTT CC	<i>N. t. PaccD</i>	Sequ.
Seq <i>PatpB</i>	GAT GGG ATT GTC TAT AAT G	<i>N. t. PatpB</i>	Sequ.
Seq <i>Prn16</i>	CTA GTT GGA TTT GCT CC	<i>N. t. Prn16</i>	Sequ.
M13-seq-fw	ACGACGTTGTAAAACGACGG		Sequ.
M13-seq-rev	TTCACACAGGAAACAGCTATGAC		Sequ.
NtRpoTpSequ1	GTGAGAAGGGAATTTAGAG	<i>N. t. RpoTp</i>	Sequ.
NtRpoTpSequ2	GTGTCATCGAATGTGATCC	<i>N. t. RpoTp</i>	Sequ.
NtRpoTpSequ3	AATCTTGATTTTCGAGGACG	<i>N. t. RpoTp</i>	Sequ.
NtRpoTpSequ3	GATAGTATGGAGGCAGCAG	<i>N. t. RpoTp</i>	Sequ.
5'At <i>PpsbA</i>	TACATTGGTTGACATGGCTAT	<i>A. t. PpsbA</i>	Klon. pMS1b
3'At <i>PpsbA</i>	ATCCAGTTACAGAAGCGACC	<i>A. t. PpsbA</i>	Klon. pMS1b
5'At <i>PrbcL/atpB</i>	GATTGGGCGATACGTC	<i>A. t. PrbcL</i>	Klon. pMS2b
3'At <i>PrbcL/atpB</i>	GAGGAGTTACTCGGAATGC	<i>A. t. PrbcL</i>	Klon. pMS2b
5'At <i>PclpP</i>	GAAATCCCATATAGCCCG	<i>A. t. PclpP</i>	Klon. pMS3b
3'At <i>PclpP</i>	CCGGTTAGTCCATAAGGG	<i>A. t. PclpP</i>	Klon. pMS3b
5'At <i>PrpoB</i>	GATTAAATCCGGGTATTGC	<i>A. t. PrpoB</i>	Klon. pMS4b

3'AtPrpoB	GAAGTAAATTAGTAGTGGCAAGTAAAG	<i>A. t. PrpoB</i>	Klon. pMS4b
5'AtPaccD	CCGTAGCCAACCGAGTAG	<i>A. t. PaccD</i>	Klon. pMS5b
3'AtPaccD	CGATATGAAATTGCGAATGTC	<i>A. t. PaccD</i>	Klon. pMS5b
5'AtPrn16	TCTCCTACCCGTATCGAATAG	<i>A. t. Prn16</i>	Klon. pMS6b
3'AtPrn16	CACTTCCCGTCCGACT	<i>A. t. Prn16</i>	Klon. pMS6b
GST-AtRpoTp_fw	GGAGCTTGAGAACCCGGGCGAAAGG	<i>A. t. RpoTp</i>	Klon. für het. Expr
GST-	GGCTTACCTTCAAGCCCGGGCTT	pCold-DNA	Klon. für het. Expr
At/NtRpoTp_rev			
GST-NtRpoTp_fw2	AATTTCCCGGGAATCGCAAATGG	<i>N. t. RpoTp</i>	Klon. für het. Expr.
GST-NtRpoTp_rev2	TCAAGCCCGGGCTTTCAGTTAAAG	<i>N. t. RpoTp</i>	Klon. für het. Expr.
GST-AtRpoTmp_fw	GTGCCCCGGGTGGGACTTTGGC	<i>A. t. RpoTmp</i>	Klon. für het. Expr.
GST-AtRpoTmp_rev	GAGGCCCGGGTTAGGGATAGG	<i>A. t. RpoTmp</i>	Klon. für het. Expr.
GST-NtRpoTmp_fw	CTTCCCGGGTTTGGTCAAGATTC	<i>N. t. poTmp</i>	Klon. für het. Expr.
GST-NtRpoTmp_rev	TTAACCCGGGATTACCTATCTAG	<i>N. t. poTmp</i>	Klon. für het. Expr.
6xHis-GEX1	TATGCATCATCATCATCACTCCCC		6xHis-tag für Expr.
6xHis-GEX2	GGGGAGTGATGATGATGATGATGCA		6xHis-tag für Expr.
At-ycf1-fw2-GEX	AAATCCCGGGTAAATATATTTACAAG	<i>A. t. ycf1</i>	Klon. für het. Expr.
At-ycf1-fw2-His	AATTCTCGAGAAATATATTTACAAG	<i>A. t. ycf1</i>	Klon. für het. Expr.
At-ycf1-rev-GEX	ATATCCCGGGACTTATTATATATAG	<i>A. t. ycf1</i>	Klon. für het. Expr.
At-ycf1-rev-His	ATCCCTGCAGTTTGTGCATATAG	<i>A. t. ycf1</i>	Klon. für het. Expr.
Ycf1-OE-rev1	CCAGTTTTTAGTTTCTTTTGCAC	<i>A. t. ycf1</i>	Klon. für het. Expr.
Ycf1-OE-fw1	GTCGCAAAAAGAACTAAAAACTGG	<i>A. t. ycf1</i>	Klon. für het. Expr.
At-ycf2-fw-GEX	TTTACCCGGGATCAATGAAAGG	<i>A. t. ycf2</i>	Klon. für het. Expr.
At-ycf2-fw-His	CAATGGTACCTAGGAGGAATC	<i>A. t. ycf2</i>	Klon. für het. Expr.
At-ycf2-rev-GEX	CTTCCCGGGTCCTGTTACATTAC	<i>A. t. ycf2</i>	Klon. für het. Expr.
At-ycf2-rev-His	CCGGCTGCAGAATGGGAAACC	<i>A. t. ycf2</i>	Klon. für het. Expr.
Ycf2-OE-rev1	GGATCGAACCATTCTTCTGAC	<i>A. t. ycf2</i>	Klon. für het. Expr.
Ycf2-OE-fw1	GTCAGAAGAAATGGTTTCGATCC	<i>A. t. ycf2</i>	Klon. für het. Expr.
Ycf2-OE-rev2	CGCATTTCATCATAGTTAGAAGC	<i>A. t. ycf2</i>	Klon. für het. Expr.
Ycf2-OE-fw2	GCTTCTAACTATGATGAATGCG	<i>A. t. ycf2</i>	Klon. für het. Expr.

Tab. A2: Verwendete Computerprogramme

Programm	Verwendung, Anbieter bzw. Verfügbarkeit im www
BLAST	Sequenz- und Homologieabgleich, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST , (Altschul <i>et al.</i> , 1990 und 1997)
Chromas Lite 2.1	Auswertung von Sequenzierdaten, http://technelysium.com.au/?page_id=13
GenePix Pro 7.0	Quantifizierung und Auswertung von <i>microarray</i> -Signalen, Molecular Devices
GPRAna	Quantifizierung und Auswertung von <i>microarray</i> -Signalen, http://www.indiji.com/gprana.htm
IGB	Auswertung von dRNA-Seq-Daten, http://www.affymetrix.com/partners_programs/programs/developer/tools/download_igb.affx , Nicol <i>et al.</i> , 2009
MASCOT	Identifizierung von Proteinen durch Peptide Mass Fingerprint, www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF
MultAlin 5.4.1	Multiple Sequenzvergleiche, http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/ , (Corpet, 1988)
NCBI	Datenbankrecherchen, www.ncbi.nlm.nih.gov/
Office Professional	Erstellung und Bearbeitung von Text, Tabellen, Kalkulationen, Abbildungen (Word, Excel, Power Point), Microsoft®
Oligo Calc	Design von Oligonukleotiden und Berechnung der Schmelztemperatur, http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html
Photoshop CS3	Erstellung und Bearbeitung von Graphiken und Abbildungen, Adobe®
Primer 3 0.4.0	Design von Oligonukleotiden, http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html
ProtParam	Berechnung von Protein-Molekulargewichten, http://web.expasy.org/protparam/ (Gasteiger <i>et al.</i> , 2005)
Quantitiy One 4.6.2	Detektion und Analyse von Radioaktiv- und Chemilumineszenzsignalen, Bio-Rad
ScanProsite	Suche nach Protein-Motiven, http://prosite.expasy.org/scanprosite/

Sequence Detection
Software 1.4
TAIR

Auswertung von qRT-PCR-Daten, Applied Biosystems

Informationssuche zu *Arabidopsis* Genen und Proteinen, <http://www.arabidopsis.org>

Tab. A3: Anbieterliste

Firma	Sitz
Applied Biosystems	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Ambion Ambion	Ambion Inc., Austin, USA
Amersham Biosciences	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Beckman	Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA
Biometra	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Bio-Rad	Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA
Biozym	Biozym Diagnostik GmbH, Hameln, Deutschland
Calbiochem	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Clontech	Clontech Laboratories, Heidelberg, Deutschland
Colgate-Palmolive	Colgate-Palmolive GmbH, Gelsenkirchen, Deutschland
Duchefa	Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, Niederlande
DuPont	DuPont de Nemours GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Epicentre	Epicentre Biotechnologies, Madison, USA
Eurofins MWG Operon	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
Fermentas	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
GE Healthcare	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Hartmann Analytic	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Deutschland
Heraeus	Heraeus, Hanau, Deutschland
Invitrogen	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Merck	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Macherey-Nagel	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Millipore	Millipore Corp., Bedford, USA
Molecular Devices	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
NEB	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
neoLab	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
Novagen	Merck Chemicals Ltd., Nottingham, Großbritannien
PeqLab	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Perkin Elmer	Perkin Elmer LAS (Deutschland), Rodgau, Deutschland
Pierce	Pierce, Rockford, USA
Promega	Promega Corp., Madison, USA
QIAGEN	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Retsch	Retsch GmbH, Haan, Deutschland
Roche	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Roth	C. Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Sartorius	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Serva	Serva Feinbiochemika, Heidelberg, Deutschland
Sigma	Sigma Chemical Company, St. Luis, USA
Stratagene	Stratagene, La Jolla, CA, USA
TaKaRa	TaKaRa Bio Europe S.A.S., Saint-germain-en-laye, Frankreich
USF	USF, Seral Reinstwassersysteme GmbH, Deutschland
Whatman	Whatman Paper, Maidstone, England

Danksagung

Ich möchte herzlich Prof. Thomas Börner danken für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, und auch für den Gedankenaustausch und die zahlreichen Anregungen während der gesamten Zeit.

Für die finanzielle Förderung meiner Arbeit danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Frauenförderung der Humboldt-Universität zu Berlin, sowie der Konsul Karl und Dr. Gabriele Sandmann Stiftung.

Für die Unterstützung und Zusammenarbeit bei speziellen Analysen gilt mein Dank Dr. Martin Meixner und Antje Sonntag (Sequenzierungen), Dr. Jörg Fettke und Sebastian Mahlow (MS Analyse), Dr. Gerd Hause (Fluoreszenzmikroskopie), Dr. Petya Zhelyazkova (dRNA-Seq), sowie Christiane Kupsch, Marlene Teubner und Sabrina Finster (RIP-Chip).

Meinem Betreuer Dr. Karsten Liere möchte ich in besonderem Maße danken für seine Motivation, Diskussionsbereitschaft und Ideen, und für die kritische Durchsicht dieser Arbeit. Unvergessen bleiben sein irritierter Blick und die beabsichtigt kargen Antworten, die stets angetrieben haben selbständig und kreativ nach Lösungen zu suchen.

Unendlicher Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe Genetik für das freundliche Umfeld das mir geboten wurde. Danke Conny für die praktische und freundschaftliche Unterstützung – du bist die gute Seele wie sie im Buche steht und ich hoffe, dass mir deine Freundschaft auch in Zukunft erhalten bleibt. Vielen Dank Janina und Lili für die lustige, ereignis- und erfahrungsreiche Zeit, und auch dafür, dass sich unsere Wege nur beruflich getrennt haben! Großen Dank auch an Hong für ihre fleißige, praktische Hilfe in den letzten Monaten meiner Arbeit.

Schließlich danke ich noch meiner Familie, sowie den besonderen Menschen in meinem Leben (Liesi, Anne, Jan und Mario), die mich in all den Jahren begleitet, unterstützt, motiviert und vor allem auch im positiven Sinne abgelenkt haben!

Wissenschaftliche Beiträge

Publikationen

Karradt, A., **Sobanski, J.**, Mattow, J., Lockau, W. and Baier, K. (2008): NblA, a Key Protein of Phycobilisome Degradation, interacts with ClpC, a HSP100 Chaperone Partner of a Cyanobacterial Clp Protease. J Biol Chem 283 [47], S. 32394-32403.

Beiträge zu wissenschaftlichen Tagungen

Vorträge:

Sobanski, J., Liere, K., Börner, T. (Sept. 2010). Expression of affinity-tagged phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis thaliana* for co-immunoprecipitation and more. 11th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, Tromsø, Norwegen.

Sobanski, J., Liere, K., Börner, T. (Dez. 2010). Analyses of *Arabidopsis thaliana* mutants expressing epitope-tagged nuclear encoded phage-type RNA polymerases. Havel-Spree-Colloquium 2010, Berlin, Deutschland.

Sobanski, J., Liere, K., Börner, T. (Sept. 2011). The development-specific role of NEP in *Nicotiana tabacum*. Botanikertagung 2011, Berlin, Deutschland.

Konferenz-Poster:

Sobanski, J., Liere, K., Börner, T. (Sept. 2009). Searching for transcription factors of the nuclear encoded phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*. Joint Symposium of German Academy of Sciences Leopoldina, SFB 429 and SFB TR1, Berlin, Deutschland.

Sobanski, J., Liere, K., Börner, T. (Sept. 2009). Searching for transcription factors of the nuclear encoded phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*. ISE-G-Tagung, Berlin, Deutschland.

Sobanski, J., Liere, K., Börner, T. (Okt. 2010). Expression of affinity-tagged phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis thaliana* for co-immunoprecipitation. 4th International Symposium of the SFB 429 "Signals, Sensing and Plant Primary Metabolism", Potsdam, Deutschland.

Sobanski, J., Liere, K., Börner, T. (Feb. 2011). Investigation of the functional role of the phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*. 24. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen, Deutschland.

Sobanski, J., Liere, K., Börner, T. (Feb. 2012). The development-specific role of the phage-type RNA polymerases in *A. thaliana* and *N. tabacum*, 25. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen, Deutschland.

Berlin, den 26.02.2013

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation im Fach Biologie eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form bei keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den 26.02.2013